

528748

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
8. April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/028562 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 39/12**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/DE2003/003179**

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. September 2003 (19.09.2003)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
102 44 863.9 23. September 2002 (23.09.2002) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **MOLOGEN AG [DE/DE];** Fabekstrasse 30, 14195
Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JUNGHANS, Claas**
[DE/DE]; Oldenburger Strasse 37, 10551 Berlin (DE).
SCHROFF, Matthias [DE/DE]; Friedbergstrasse 5, 14057
Berlin (DE). **JUHLS, Christiane** [DE/DE]; Pestalozzi
Strasse, 10627 Berlin (DE). **OSWALD, Detlef** [DE/DE];
Paul-Linke-Ufer 33, 10999 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **BOECKH, Tobias; HERTIN** Anwaltssozietät,
Kurfürstendamm 54/55, 10707 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen (Regel 4.17 Ziffer iii) für alle Bestimmungsstaaten

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: **VACCINE AGAINST INFECTIONS CAUSED BY ONCOVIRUSES SUCH AS THE FELINE LEUCOSIS VIRUS OF CATS**

(54) Bezeichnung: **IMPFSTOFF GEGEN INFEKTIONEN MIT ONKOVIREN, WIE DEM FELINEN LEUKOSEVIRUS DER KATZE**

(57) Abstract: The invention relates to a vaccine which can induce protection against illnesses caused by a lentivirus infection, especially an infection caused by the feline leucosis virus (FeLV). One such vaccine contains codon-optimised DNA sequences which code for structural proteins and the most important membrane protein of the FeLV.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft einen Impfstoff, welcher einen Schutz gegen Erkrankung infolge einer Lentivirusinfektion, insbesondere eine Infektion mit dem feline Leukosevirus (FeLV) induzieren vermag. Ein solcher Impfstoff enthält kodon-optimierte DNA-Sequenzen, die für Strukturproteine und das wichtigste Membranprotein des FeLV kodieren.

REST AVAILABLE COPY

WO 2004/028562 A2

**Impfstoff gegen Infektionen mit Onkoviren,
wie dem feline Leukosevirus der Katze**

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft einen Impfstoff auf DNA-Basis, durch den Katzen gegen Infektionen mit dem feline Leukosevirus geschützt werden können.

Das feline Leukosevirus (FeLV) ist ein katzenspezifisches, weltweit verbreitetes Virus, das Auslöser schwerer Erkrankungen ist, und zu den Haupttodesursachen der feline Population zählt. Derzeit besteht eine Infektionsrate von 12% bis 16% der Katzen sowohl in Europa als auch in den USA.

Ein Teil der Katzen kann die Infektion überwinden; es ist im Gegensatz dazu jedoch auch eine lebenslange Viruspersistenz im Organismus möglich. Latent infizierte Katzen gelten dann als Erregerreservoir.

Eine wirksame Therapie von FeLV-Infektionen, die zu einer Heilung führt, ist zur Zeit nicht möglich. Bestenfalls gelingt ein Zurückdrängen der Krankheit für eine gewisse Zeit. Bestimmte Chemotherapeutika sind auch bei der Katze anwendbar, die Nebenwirkungen sind jedoch wie in der Humanmedizin hochproblematisch. Noch im Versuchsstadium befindet sich die Behandlung mit Interferonen.

Virostatika sind nicht in der Lage, das Virus zu inaktivieren und führen damit ebenfalls zu keinem Heilerfolg.

Eine wirksame Bekämpfung von FeLV-Infektionen kann nur vorbeugend durch Impfung erreicht werden.

Stand der Technik

Derzeitig erhältliche Impfstoffe gegen FeLV beruhen entweder auf inaktivierten FeLV-Viren, auf rekombinant hergestellten Proteinen, sogenannten Subunit-Vakzinen, oder auf dem Einsatz von genetisch modifizierten Lebendvakzinen. Allerdings weisen diese Arten von Impfstoffen neben unzulänglichem Impferfolg eine Reihe weiterer Nachteile auf.

So führen Zubereitungen aus inaktivierten Viren nur bei einem Teil der geimpften Tiere zur erwünschten Immunität. Bei diesen Impfstoffen handelt es sich immer um Proteingemische, in denen hochimmunogene Antigene mit einer großen Menge anderer Proteine um die Präsentation durch das Immunsystem "konkurrieren" müssen. Zudem können nach erfolgter Impfung starke Nebenwirkungen, wie allergische Reaktionen und Autoimmun-Erkrankungen, auftreten.

Ein rekombinanter Impfstoff, der aus biotechnologisch hergestelltem Hüllprotein des FeLV besteht und mit Aluminiumhydroxid und Saponin adjuvantiert ist, ist derzeit ein häufig eingesetzter Impfstoff. Impfungen mit dieser Vakzine führen bei 80 bis 95% der Katzen zum Schutz gegen Leukose (Lutz et al., 1991, J Am Vet Med Assoc;199(10):1446-52).

Problematisch ist jedoch das Risiko des Auftretens von Fibrosarkomen an der Impfstelle. Ein weiterer Nachteil dieses Impfstoffes ist, dass die erwirkte Immunität hauptsächlich auf der Bildung virusneutralisierender Antikörper beruht. Neuere Untersuchungsergebnisse (Flynn et al., 2000, Immunology 101, 120-125) zeigen jedoch, dass zur Ausbildung einer schützenden Immunität die zelluläre Immunantwort ebenfalls von sehr großer Bedeutung ist.

Der Einsatz von Lebendvakzinen hat sich zwar hinsichtlich der erzielten Immunität als effektiv erwiesen, birgt jedoch die ständige Gefahr in sich, dass sich die verwendeten Virusstämme durch Mutation oder Rekombination zu neuen pathogenen Virusstämmen entwickeln. Ebenso muss beachtet werden, dass bei der Anwendung von solchen Impfstoffen, die sämtliche Virusstrukturen enthalten, sich auf Grundlage des Antikörperstatus nicht mehr unterscheiden lässt, ob die Tiere infiziert oder im-

munisiert sind. Aus diesen beiden Gründen eignen sich diese Impfstoffe nicht für die Praxis.

- Ein weiteres Beispiel für eine aus infektiösen- oder replikationsfähigen Viren bestehende Vakzine ist ein rekombinantes, FeLV-Oberflächenproteine exprimierendes Kanarienvakzinenvirus. In Testinfektionen konnten 83% der Tiere vor der Infektion geschützt werden (Jarrett et al., 1993, J of Virology: 2370-2375). Allerdings weist dieser Impfstoff die Nachteile einer Lebendvakzine in Bezug auf unvorhersagbare Rekombinationen auf, weiterhin ist er relativ aufwendig und damit teuer herzustellen und zu charakterisieren.
- 10 Neben solchen klassischen und modernen rekombinanten Impfstoffen gibt es die Möglichkeit der Impfung mit DNA-Expressionskonstrukten. Dabei wird nur die Information für bestimmte immunogene Teile des Erregers in Form von DNA dem Impfling verabreicht. Nach Impfung werden die FeLV-Antigene von den Zellen der geimpften Katze exprimiert, und stimulieren so eine Immunantwort gegen das Virus.
- 15 Diese Möglichkeit, durch Injektion von Antigen kodierenden DNA-Expressionskonstrukten eine Immunantwort gegen dieses Antigen zu erzielen, ist zuerst von Tang und Ulmer für die Maus publiziert worden (Tang et al., 1992, Nature 365, 152-154; Ulmer et al., 1993 Science 259, 1745-1749) und seither in einer großen Menge von Spezies gezeigt worden. Es ist anzunehmen, dass das generelle Prinzip der Impfung mit Immunogen-kodierenden Nukleinsäuren auf alle höheren Tiere übertragbar ist. Hinsichtlich der Wahl geeigneter Antigene, deren Kodierung in Nukleinsäuresequenzen sowie der Wahl des geeigneten Impfregimes stellen sich dem Fachmann für jede Anwendung eine Reihe zum Teil nur schwer überwindbarer Probleme, was dazu geführt hat, dass bisher noch keine Vakzine auf DNA-Basis in
- 20 eine Erprobung in der klinischen Phase 2 oder 3 aufgenommen wurde.
- 25

Die Impfung von Katzen mit Expressionskonstrukten zur Expression der Gene "env" und "gag" ist in der französischen Patentschrift FR 2 751 223 beschrieben. Die dort skizzierte Erfindung ist allerdings rein hypothetisch und nicht ausreichend offenbart; so sind keinerlei Expressions- und Immunisierungsversuche oder deren Ergebnisse

30 gezeigt. Es handelt sich um eine rein spekulative Anmeldung.

Versuche zur DNA-Immunisierung auf dem Gebiet des FeLV, die allerdings nicht zu einem überzeugenden Erfolg führten, sind bekannt (Jarrett et al., 2000 Immunology 101, 120-125). In der vorzitierten Arbeit war das Gesamtgenom mit einer Polymerase-deletion als Expressionskonstrukt inokuliert worden. Der klinische Erfolg der Impfung schlug sich allerdings nicht in einem Schutz der Katzen vor Infektion und Virämie nieder. Neben diesem praktischen Nachteil des zitierten Impfversuchs hat die Verwendung von Deletionsmutanten oder deren Genom zur Impfung den Nachteil, dass die Gefahr besteht, dass aus einem deletierten Virus durch Rekombination mit endogenen oder exogenen Virussequenzen infektiöse, neuartige Pathogene entstehen.

Im Gegensatz zu der zitierten Arbeit von Jarrett war das Ziel der Bemühungen der vorliegenden Erfindung, nur isolierte Antigene des FeLV zur Expression zu bringen. Vorversuche zeigten allerdings, dass durch Inokulation von Expressionskonstrukten, die homologe Wildtyp-Sequenzen des "env"- und "gag"-Gens des FeLV unter Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) early-immediate Promotors kodierten, keine Antikörperproduktion in Katzen provozierbar war. Weitere Versuche zeigten ebenfalls, dass die betreffenden Sequenzen in menschlichen und aus Katzen gewonnenen Zelllinien nicht oder nur in sehr geringem Maße exprimiert wurden. Dieses Phänomen ist für Sequenzen des HI-Virus sowie andere Lentiviren bekannt (Wagner et al., 2000, Hum Gene Ther 11(17), 2403-2413). Die Expression der Wildtypsequenzen in der infizierten Zelle ist dabei abhängig von der vorhergehenden Expression des viral kodierten Proteins "rev".

Die Expressionskontrolle des nicht zur Klasse der Lentiviren gehörenden Retrovirus FeLV ist unbekannt und ein der "rev"-Kontrolle ähnlicher Mechanismus ist weder gezeigt noch in der Literatur postuliert worden.

Ebenfalls bekannt ist, dass durch Optimierung der Kodonbenutzung (Codon Usage Optimization) innerhalb des Expressionskonstruktes an die präferentiell in Säugern benutzten Kodons die Expression von Proteinen erheblich gesteigert werden kann (Grantham et al., Nucleic Acids Res 1980, 9:1893-912). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Expressionssteigerung verschiedener viraler Strukturproteine des HIV-1 und SIV angewandt. Der Effekt beruht auf der Umgehung der "rev"-abhängigen Transportwege für das extrem AT-reiche Transkript dieser späten Pro-

- teine im Replikationszyklus der Lentiviren. So gelang es durch Kodonoptimierung der DNA Sequenzen des „env“ und des „gag“ Proteins des menschlichen HI-Virus, weitaus höhere Antikörpertiter gegen diese synthetischen Antigene in Mäusen zu erzielen, als es durch die Wildtypsequenzen möglich war (Haas et al., 1998, J Virol. 72: 1497-503, Wagner et al., Hum Gene Ther. 2000,17:2403-13). Die Herstellung und der Gebrauch solcherart optimierter Sequenzen zur Vakzinierung gegen HIV-1 ist auch bekannt aus der WO 00/029561 und der WO 97/48370.

- Ein anderes Problem besteht in der Applikation der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA. Ein Nachteil der im Moment zum DNA Transport (Transfektion) verwendeten Vektoren besteht darin, dass entweder Vektoren viralen Ursprungs eingesetzt werden, die vom Aspekt der Sicherheit Probleme aufwerfen (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518), oder aber Plasmide genutzt werden. Da Plasmide durch bakterielle Fermentation gewonnen werden, enthalten sie neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA sowie üblicherweise Resistenzgene gegen bei der Fermentation verwendete Antibiotika. Die Problematik wird in der WO 98/21322 ausführlich diskutiert. Erwähnt sei, dass bei der Verwendung von Genexpressionskonstrukten auf Basis von Plasmid-DNA das inhärente Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei großangelegten Schutzimpfungen nicht vertretbar ist, besteht.

- Eine andere Art von DNA-Vektor sind kovalent geschlossene minimalistische DNA-Konstrukte, wie sie in der EP 0 914 318 B1 offenbart werden. Insbesondere deren Anwendung in Form von peptid-gekoppelten DNA-Konstrukten führt zu einer überraschenden, qualitativ verbesserten Immunantwort im Vergleich zu unmodifizierter Plasmid-DNA (siehe auch DE 101 56 679.4 und DE 101 56 678.6).

- Neben den Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfermethoden bedingt sind, ist es bisher nicht gelungen, einen effektiven und sicheren Impfstoff gegen FeLV zu entwickeln. Bis heute beschränkt sich die Behandlung einer FeLV-Infektion auf die Stärkung der Abwehrkräfte der Tiere und die Behandlung der Begleit- und Sekundärinfektionen. Die vorhandenen Impfstoffe bringen die eingangs genannten Nebenwirkungen mit sich.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen, der in Katzen zu einem Schutz vor Infektionen mit FeLV führt, sowie geeignete diagnostische Werkzeuge zur Verfügung zu stellen.

5 Lösung der Aufgabe und Vorteile der Erfindung

Erfindungsgemäß wird dieses Ziel dadurch erreicht, dass Katzen mit einem Gemisch (Cocktail) aus synthetisch hergestellten, kodon- und spleiß-Signal-optimierten DNA-Sequenzen immunisiert werden, die für Strukturproteine ("gag"), sowie das wichtigste Membranprotein ("env") des FeLV kodieren.

- 10 Im Zuge der Kodon- und Spleiß-Optimierung der verwendeten DNA-Sequenzen wurden auch mutagenisierte DNA-Sequenzen erhalten, welche zur Substitution einzelner Aminosäuren bei den Strukturproteinen ("gag") und dem wichtigsten Membranprotein ("env") des FeLV führten. Überraschenderweise wiesen diese Proteine mit veränderter Aminosäuresequenz die erfindungsgemäßen Vorteile auf. Daher ist im
- 15 Sinne dieser Erfindung die Kodon- und Spleiß-Optimierung eine Strategie zur Veränderung der Aminosäuresequenz der Strukturproteine ("gag"), sowie des wichtigsten Membranproteins ("env") des FeLV.

Im Sinne der Erfindung bedeuten hierbei

„env“:	Gensequenz, die für die viralen Hüllproteine der inneren Virusverpackung des feline Leukosevirus kodiert
„gag“:	Gensequenz, die für die viralen Strukturproteine der inneren Virusverpackung des feline Leukosevirus kodiert
FeLV:	feline Leukosevirus
WT:	Wildtyp
WT „env“:	Wildtyp der „env“ DNA Sequenz, entnommen der NCBI-Datenbank, Acc. No. M12500

- 7 -

WT „gag“:	Wildtyp der „gag“ DNA Sequenz, gewonnen aus dem Blut infizierter Katzen (siehe Beispiel 1), keine Sequenz aus einer Datenbank, jedoch homolog zu einer solchen
NLS:	Kern-Lokalisierungssequenz (<u>N</u> uclear <u>L</u> ocalization <u>S</u> ignal)
ODN:	<u>O</u> ligode <u>s</u> oxynukleotid
PCR:	Polymerase Chain Reaction
LeadFeLVenv (FeLVenv):	FeLV “env” Sequenz mit Signalsequenz
LeadFeLVenvgp85 (FeLVenvgp85):	FeLV “env” Sequenz (gp85) mit Signalsequenz

Die Gensequenz “gag” kodiert für die viralen Strukturproteine der inneren Virusverpackung, die Gensequenz “env” für die viralen Hüllproteine. Das Protein, das die höchste Immunogenität der in der “env” Sequenz kodierten Proteine besitzt, ist das Glykoprotein gp70. Gegen das gp70 werden im Katzenorganismus virusneutralisierende Antikörper gebildet. Diese Antikörper stellen die erste Immunantwort nach dem Eindringen des Erregers in den Körper dar, die unter Umständen schon ausreichend zur Überwindung der Infektion sein kann.

Ob membranständige oder sekretorische Proteine besser geeignet sind, virusneutralisierende Antikörper zu induzieren, wird kontrovers diskutiert. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene für “env” kodierende Konstrukte hergestellt. Da bekannt ist, dass die p15 Sequenz der “env” Gensequenz mindestens einen immunmodulatorisch wirksamen Sequenzabschnitt enthält, der die Antikörperbildung unterdrückt (Haraguchi et al., 1997, Journal of Leukocyte Biology, 61, 654-666), wurde neben einem Konstrukt kodierend für gp70 und p15 (gp85), ein weiteres hergestellt, welches nur das gp70 enthielt und damit zur Expression des sekretorischen “env” Proteins ohne Transmembranteil führt.

Eine Vakzine, die sowohl virusneutralisierende Antikörper gegen das gp70, als auch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren kann, stellt demnach eine deutliche

Verbesserung gegenüber den bisher erhältlichen Impfstoffen dar und könnte gegebenenfalls auch zur Therapie infizierter Katzen eingesetzt werden.

Um mehr Antigen in-vivo zu exprimieren und damit eine stärkere Immunantwort auszulösen, die sich in einem wirksamen und dauerhaften Schutz vor der FeLV-
5 Infektion zeigt, wurden die Wildtyp Sequenzen von "gag" und "env" optimiert. Unter Optimierung soll die Kodon-Anpassung, auch als "Codon-Usage-Optimization" bezeichnet, verstanden werden.

Jede Aminosäure kann durch mehrere Kodons verschlüsselt werden. Die Häufigkeit, mit der die einzelnen Kodons während der Transkription abgelesen werden, variiert
10 sehr stark zwischen Viren, Bakterien und Vertebraten. Dementsprechend variiert auch die Häufigkeit der entsprechenden tRNAs in der Zelle. Virale Genome haben zum Teil eine von der Wirtszelle abweichende Kodon-Nutzungsfrequenz, was wahrscheinlich ein Element der Expressionskontrolle der Viren ist. Durch Adaption der Sequenz an das wirtsspezifische Kodon-Nutzungsmuster können diese viralen
15 Steuermechanismen unterlaufen sowie die Expression von Antigen erheblich gesteigert werden.

Deshalb war das Ziel der Experimente, durch Umschreibung der viralen Sequenzen in Sequenzen, die eine für Vertebratengenome optimale Kodon-Nutzung repräsentieren, eine viel stärkere Expression der Antigene zu erreichen. Dazu wurde eine
20 Klonierungsstrategie entwickelt, die die Synthese dieser optimierten DNA-Sequenz aus Oligonukleotiden ermöglichte.

Die synthetischen Sequenzen wurden in Plasmide inseriert, in E.coli vervielfältigt, zur Kontrolle sequenziert und anschließend in Zellen einer Katzenzelllinie transfiziert, um die Expression der kodierten Proteine zu testen.

25 Der Nachweis der Expression der Antigene wurde mit Hilfe von Westernblots geführt.

Der Nachweis der Expression der Proteine durch die FeLV-Wildtyp Sequenzen (WT) von "env" und "gag" erfolgte mit Hilfe des Westernblots. Durch Immunpräzipitation konnte "env" ebenso wie "gag" nur durch sehr schwache Banden nachgewie-

- sen werden. Überraschenderweise war dies auch für die kodon-optimierten "env"-Sequenzen der Fall. Nur bei "gag" führte die Kodon-Optimierung zu einer deutlich verbesserten Expression, wie Fig. 1 belegt. Nach Überprüfung zahlreicher anderer Hypothesen, die die mangelhafte Expression der synthetischen Gene erklären sollten, wurde die synthetische "env" Sequenz auf durch bioinformatisch vorhergesagte Spleißsignale (splice-sites) überprüft. Eine Reihe der vom verwendeten Programm (Complign PPC, Mac Molly Tetra Version 3.10a (Softgene GmbH)) vorhergesagten Spleißsignale wurde durch Punktmutation beseitigt, um die Hypothese zu verifizieren, dass das Auftreten solcher Strukturen die Expression der Gene im Zusammenhang mit dem verwendeten Promoter behindere. Es gelang überraschenderweise durch diese Maßnahme, "env" im Westernblot als starke Proteinbande nachzuweisen (s. Fig. 2). Die erfindungsgemäßen synthetischen Antigensequenzen zeigen durch die kräftigen Banden die erfolgreiche und verstärkte Expression der Antigene.
- 15 Es wird generell ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke eines Expressionssystems und der resultierenden Stärke der Immunantwort vermutet, wenn auch zahlreiche Befunde nahe legen, dass weder ein linearer Zusammenhang besteht, noch zwingend jede Behandlung mit Expressionsvektoren Immunität in der gewünschten Stärke nach sich zieht (Wherry et al., Journal of Immunology 2002, 168 pp 4455-4461). Deshalb wurden nach Vorliegen der *In-vitro*-Expressionsergebnisse Mäuse mit peptid-gekoppelten Expressionskonstrukten immunisiert, die für das kodonoptimierte und spleißsignal-optimierte "env" kodierten. Die Vorteile solcher peptidgekoppelten Konstrukte bei der Herbeiführung einer Immunantwort sind in den Schriften EP 0 941 318 B1 und DE 101 56 678 A1 ausführlich erläutert. Zur Klärung der immunologischen Bedeutung des p15 Proteins des "env" bei der Auslösung einer Immunantwort wurden beide erfindungsgemäße für "env" kodierende Sequenzen eingesetzt (Seq.ID 7, 8, sowie 9 und 10). Die Seren der immunisierten Mäuse wurde auf spezifische Antikörper gegen das FeL-Virusprotein "env" mittels Westernblot untersucht. Anhand der Antikörperlevel nach der Zweitimmunisierung in Woche 4 ist erkennbar, dass die synthetischen Konstrukte auch *in-vivo* zu einer starken Stimulation der Antikörperbildung führen. Im Vergleich zeigten fünf von sechs Mäuse der Gruppe 4 eine starke Immunantwort auf die erfindungsgemäße Antigensequenz, wohingegen der WT (Gruppe 1) zum Auslösen einer schwachen Antikörperantwort bei nur zwei von sechs Tieren führte (s. Fig. 3).

Als DNA-Expressionskonstrukte können Plasmide eingesetzt werden, bevorzugt werden aber erfindungsgemäß minimalistische immunologisch definierte Genexpressionskonstrukte verwendet. Dabei handelt es sich um lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen. Diese kovalent geschlossenen minimalistische DNA-Konstrukte werden im folgenden als Midge Vektoren bezeichnet (MIDGE: MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTOR); vgl. EP 0 941 318 B1. Die Midge-Konstrukte haben den Vorteil, dass mit ihnen auf Strukturen verzichtet werden kann, die für deren medizinische Wirkung nicht essentiell sind, was die Nachteile der herkömmlichen Genfähren vermeidet.

Zur Transfektion können biologische, chemische und/oder physikalische Methoden eingesetzt werden, die zum Stand der Technik gehören, beispielsweise Transfektion mittels ballistischem Transfer. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Transfektion mittels intradermaler Injektion durch Spritzen oder nadelfreier Injektionsgeräte.

Die Erfindung hat Expressionskonstrukte zum Gegenstand, die zur Expression von Antigenen des FeLV in Säugerzellen führen. Die Erfindung stellt somit einen Impfstoff zur Verfügung zu stellen, der in Katzen zu einem Schutz vor Infektionen mit FeLV führt und den Sicherheitsaspekt berücksichtigt. Erfindungsgemäß wird auf herkömmliche Adjuvantien verzichtet, so dass damit die Gefahr der Fibrosarkombildung an der Injektionsstelle ausgeschlossen werden kann.

Weitere vorteilhafte Methoden sind die biologischen Transfektionsmethoden wie der peptidgekoppelte Gentransfer. Hierbei beispielsweise wird ein DNA-Expressionkonstrukt, das für mindestens die erfindungsgemäße "env" und mindestens die erfindungsgemäße "gag" Sequenz des FeLV kodiert, kovalent mit einem Oligopeptid verbunden, welches vorzugsweise die Kern-Lokalisierungssequenz (Nuclear Localization Signal = NLS) aus dem Simian Virus SV-40 ist.

Nach den positiven Ergebnissen im Mausexperiment wurden Katzen mit den Expressionskonstrukten immunisiert und auf ihren Antikörperstatus untersucht.

Das beigefügte Sequenzprotokoll, welches Bestandteil der Anmeldung und vorliegenden Beschreibung ist, gibt folgende Sequenzen wieder:

<u>Seq. ID</u>	<u>Sequenzname/-beschreibung</u>
	Seq.ID1 DNA-Sequenz des Wildtyps des "env"-Gens
5	Seq.ID2 DNA-Sequenz des Wildtyps des "gag"-Gens
	Seq.ID3 Proteinsequenz des Wildtyps des "env"-Gens
	Seq.ID4 Proteinsequenz des Wildtyps des "gag"-Gens
	Seq.ID5 DNA-Sequenz des mutagenisierten "gag"-Gens
	Seq.ID6 Proteinsequenz des mutagenisierten "gag"-Gens
10	Seq.ID7 DNA-Sequenz des mutagenisierten "env"-Gens (gp85). Die gp70 Sequenz ist hierbei um die für das immunogene Protein p15 kodierende Nukleotidsequenz verlängert.
	Seq.ID8 DNA-Sequenz des mutagenisierten "env"-Gens (gp70)
	Seq.ID9 Proteinsequenz des mutagenisierten "env"-Gens (gp85)
15	Seq.ID10 Proteinsequenz des mutagenisierten "env"-Gens (gp70)
	Seq.ID11 DNA-Sequenz des Wildtyps des „env“-Gens (gp70), entnommen der Seq.ID1 (NCBI-Datenbank, Acc. No. M12500).
	Seq.ID12 bis Seq.ID40 Sequenzen der verwendeten Primer entsprechend den nachfolgenden Beispielen.
20	Erfindungsgemäß ist daher vorgesehen ein DNA-Expressionskonstrukt zur Expression von Genprodukten des Felinen Leukosevirus (FeLV) in Katzenzellen, bestehend aus einer in Feliden operablen Promotorsequenz und mindestens einer Nukleotidsequenz, die verwandt ist mit einer für ein originäres Strukturprotein („gag“) und/oder Membranprotein („env“) des FeLV kodierenden Wildtyp-Nukleotidsequenz,
25	wobei besagte Nukleotidsequenz des FeLV verändert ist und keine offenen oder versteckten Splice-Donor und/oder Akzeptorsequenzen aufweist und für ein mit dem

originären Strukturprotein („gag“) und/oder dem originären Membranprotein („env“) des FeLV hochgradig homologes aber nicht identisches Protein oder einen hochgradig homologen aber nicht identischen Teil derselben kodiert. Die mit dem originären Strukturprotein („gag“) und/oder dem originären Membranprotein („env“) des FeLV hochgradig homologen aber nicht identischen Proteine weisen eine Homologie zum korrespondierenden Wildtyp von wenigstens 98% auf. Bevorzugt ist ein Expressionskonstrukt enthaltend die Sequenzen Seq.ID5, Seq.ID7 und/oder Seq.ID8.

Die Struktur- und/oder Membranproteine werden ganz oder teilweise durch die entsprechenden Nukleotidsequenzen kodiert. Bei dem Expressionskonstrukt handelt es sich entweder um ein Plasmid oder um ein solches Konstrukt, bei dem die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen und wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, und wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz besteht.

Zur besseren Transfektion kann das Expressionskonstrukt mit einem oder mehreren Peptiden kovalent verknüpft sein. Bevorzugt ist ein Peptid aus 3 bis 30 Aminosäuren, von denen mindestens die Hälfte basische Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin kommen, insbesondere ein Peptid mit der Aminosäuresequenz PKKKRKV (Polin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin).

Erfindungsgemäß sind aber auch Proteine vorgesehen, welche ein mit dem originären Strukturprotein („gag“) des Felines Leukosevirus (FeLV) hochgradig homologes Protein (Seq.ID6) oder mit dem originären Membranprotein gp85 („env“) des FeLV (Seq.ID9) oder mit dem originären Membranprotein gp70 („env“) des FeLV (Seq.ID10) darstellen. Diese Proteine wiederum können zur Antikörperproduktion (monoklonale oder polyklonale Antikörper) verwendet werden, die wiederum Bestandteil von diagnostischen Kits zur Diagnose von Infektionen bei Katzen mit dem Felines Leukosevirus sind.

Das erfindungsgemäße Expressionskonstrukt ist als Bestandteil eines Arzneimittels, insbesondere einem Impfstoff zur Erzeugung einer präventiven und/oder therapeutischen Immunität bei Feliden, insbesondere der Katze, vorgesehen.

- 5 Weitere vorteilhafte Ausgestaltungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen und der Beschreibung. Die überraschende Wirkung des erfindungsgemäßen Arzneimittels (als Impfstoff zur FeLV Therapie), sowie das erfindungsgemäße Verfahren wird anhand der Figuren und Ausführungsbeispiele deutlich. Dabei bedeuten:

Midge-NLS-FeLVenvgp85(-spleiß)	oder	NLS-gekoppelter Midgevektor kodierend
Midge-NLS-FeLVgp85(-spleiß)		für die kodon-u. spleißsignal.optimierte
		"env"-Sequenz mit p15 (gp85)
Midge-NLS-FeLVenvgp70(-spleiß)	oder	NLS-gekoppelter Midgevektor kodierend
Midge-NLS-FeLVgp70(-spleiß)		für die kodon-u. spleißsignal.optimierte
		"env"-Sequenz ohne p15 (gp70)
Midge-NLS-WT		NLS-gekoppelter Midgevektor kodierend
		für den WT des "env"-Gens
mAK vs. gp70		monoklonaler Antikörper gegen gp70
Positivkontrolle		Impfstoff Leucogen
Puffer		PBS, Negativkontrolle

Es zeigt:

- 10 Fig.1: in-vitro Expressionsvergleich des WT "gag"-Proteins und des kodon optimierten "gag"-Proteins. Aufgetragen sind Katzenzelllysate, die zuvor mit folgenden Konstrukten transfiziert wurden. Das „gag“ Vorläufer-Protein hat eine Größe von 55 kDa:

- 15 Spur 1 u. 2: für "gag"-WT kodierende Expressionsvektoren
 Spur 3: für kodon-optimiertes "gag" kodierende Expressionsvektoren
 Spur 4: nichtinfizierte Katzenzellen, Negativkontrolle
 Spur 5: leer
 Spur 6: mit Virus infizierte Katzenzellen, Positivkontrolle
 Spur 7: Boa-Proteinmarker

Die Expression durch den WT führt zu sehr schwachen Proteinbanden (1 und 2), wohingegen eine starke Expression durch die erfindungsgemäße Sequenz erreicht wird (3). Zum Vergleich dienen infizierte Katzenzellen (6). Das „gag“ bezeichnet ein Vorläuferprotein, welches in der infizierten Zelle mit Hilfe von Proteasen in Strukturproteine des FeLV zerlegt wird. Das am stärksten immunogen wirkende Strukturprotein ist das p27, das deshalb von einem Antiserum gegen das Gesamtvirus sehr gut erkannt wird. Dadurch ist es erklärlich, das in Spur 6 sowohl eine 55 kDa für das gesamte „gag“ als auch eine 27kDa Bande erkennbar ist. Im Gegensatz dazu enthält Spur 3 keine Viruspartikel, sondern mit dem „gag“ Gen transfizierte Zellen, dies führt offensichtlich nicht zum Abbau des „gag“ Genes in die Virusproteine mit Hilfe von Proteasen, sondern zur unspezifischen Degradation des gesamten Vorläuferproteins durch zelleigene Proteasen.

Fig.2: in-vitro Expressionsvergleich des WT „env“-Gens und der kodon-u. spleiß-signaloptimierten „env“-Sequenz (gp85). Aufgetragen sind Katzenzelllysate, die zuvor mit folgenden Konstrukten transfiziert wurden:

Spur 1:	Boa-Proteinmarker
Spur 2:	nichtinfizierte Katzenzellen, Negativkontrolle
Spur 3:	mit Virus infizierte Katzenzellen, Lysat, Positivkontrolle
Spur 4:	leer
Spur 5:	mit Virus infizierte Katzenzellen, Präzipitat, Positivkontrolle
Spur 6:	nichtinfizierte Katzenzellen, Präzipitat, Negativkontrolle
Spur 7:	weitere Negativkontrolle zum spezifischen „env“-Nachweis
Spur 8:	leer
Spur 9:	für kodon- und spleißsignaloptimiertes FeLVenvgp85(-spleiß) kodierende Expressionsvektoren
Spur 10:	leer
Spur 11:	für kodonoptimiertes FeLVenvgp70(-spleiß) kodierende Expressionsvektoren

Die Kontrolle in Spur 5 führt zu einer deutlichen Proteinbande, die als Positivkontrolle für die Expression des envgp85 genutzt werden kann. Spur 9 zeigt, das die erfindungsgemäße FeLVenvgp85(-spleiß) Sequenz zur Expression des gp85 Proteins führt. In Spur 11 ist das erfindungsgemäße FeLVenvgp70(-spleiß) aufgetragen. Die Abwesenheit der 70kDa Bande beruht

darauf, das das envgp70 im Gegensatz zum gp85 ein sekretorisches Protein ist, das sich im Zelllysate schwer oder kaum nachweisen lässt.

Fig.3: in-vivo Ergebnisse nach Immunisierung von Mäusen mit für "env"-kodierenden Expressionskonstrukten. Dabei bedeuten:

- 5 A: Positivkontrolle
 B: Puffer

Die Antikörperbestimmung erfolgte in Woche 4 nach der Zweitimmunisierung. In Gruppe 3 sind 3 von 6 Mäuseseren antikörperpositiv (Gelspuren unter dem Pfeil: Midge-NLS-FeLVgp85(-spleiß)), in der 4. Gruppe 5 Seren stark positiv und 1 schwach positiv (Gelspuren unter dem Pfeil: Midge-NLS-FeLVgp70(-spleiß)). Dagegen zeigen die mit dem WT immunisierten Tiere der Gruppe 5 nur in zwei Fällen sehr schwache positive Antikörpersignale (Gelspuren unter dem Pfeil: Midge-NLS-WT). Der Versuch zeigt, dass die optimierten Sequenzen auch in-vivo zu einer deutlich verstärkten Antikörperbildung gegenüber dem WT führen und bestätigt die Ergebnisse der in-vitro Experimente.

10
15

Fig. 4: DNA-Sequenzvergleich Wildtyp „gag“-Gen (Seq.ID2) vs. :kodon-optimiertes „gag“-Gen (Seq.ID5). Ähnlichkeit: 74.51%

Fig. 5: DNA-Sequenzvergleich Wildtyp „env“ (gp70-Region aus Seq.ID1) vs. kodon- und spleißsignal optimiertes „env“-Gen (gp70; Seq.ID8). Ähnlichkeit: 75.75%

20

Fig. 6: DNA-Sequenzvergleich Wildtyp „env“-Gen (Seq.ID1) vs. kodon- und spleißsignal optimiertes „env“-Gen (gp85) (Seq.ID7). Ähnlichkeit: 80.25%

Fig. 7: Protein-Sequenzvergleich: Proteinsequenz des Wildtyps des „gag“-Gens (Seq.ID4) vs. Proteinsequenz des kodon-optimierten „gag“-Gens (Seq.ID6). Ähnlichkeit : 98.62%

25

Fig. 8: Protein-Sequenzvergleich: Wildtyp des „env“-Protein (Seq.ID3) vs. Proteinsequenz des kodon- und spleißsignal-optimierten „env“-Proteins (gp70) (Seq.ID10). Ähnlichkeit: 98,75%

Fig. 9: Protein-Sequenzvergleich: Wildtyp des „env“-Protein (Seq.ID3) vs. Proteinsequenz des kodon- und spleißsignal-optimierten „env“-Proteins (gp85) (Seq.ID9). Ähnlichkeit : 98.60%

Die Ergebnisse belegen, dass die codon- und spleißsignaloptimierten DNA-Sequenzen sowohl des „env“ als auch des „gag“ Gens des FeLV eine Homologie zum entsprechenden Wildtyp von wenigstens 74 % aufweisen. Daraus resultierend ergeben sich Proteinsequenzen des „env“ und des „gag“ Proteins mit einer Homologie zum korrespondierenden Wildtyp von wenigstens 98%. Es sind durchaus andere Optimierungen an der DNA-Sequenz des „env“ als auch des „gag“ Gens des FeLV denkbar, die zu einem ähnlichen Resultat führen, dass heißt einer hohen Homologie zwischen originärem Wildtyp und der (aus der Optimierung resultierenden) Proteinsequenz. Auch solche Optimierungen werden als im Sinne der Erfindung verstanden.

Beispiel 1: Wildtyp (WT)-Sequenzen

Die Wildtyp-Sequenzen der ausgewählten Antigene , insbesondere für das „gag“ Gen, wurden aus dem Blut infizierter Katzen gewonnen. Die DNA-Sequenz für „env“ WT ist in Seq. ID 1 (NCBI-Datenbank, Acc. No. : M12500), für „gag“ WT in Seq. ID 2 wiedergegeben. Die entsprechenden Aminosäuresequenzen in Seq. ID 3 („env“) und Seq.ID 4 („gag“).

Primer für „gag“ WT:

Zur Beseitigung von zwei Eco 31I Schnittstellen wurden 3 PCR mit folgenden Mutationsprimern durchgeführt:

gag-mut1-rneu (Seq.ID12):

AATTAAGAGCTCCACGTCTCCCCCGCTAACAGCAACTGGCG

gag-mut2-l (Seq.ID13):

AATTAAGAGCTCCAGGTCTCCGGGGCTCCGCGGGGCTGCAAGACG

gag-mut3-r (Seq.ID14):

AATTAAGAGCTCCACGTCTCCTTCCCTTTTGTGTATATCTTTTCTGC

- 17 -

gag-mut4-l (Seq.ID15):

AATTAAAGAGCTCCAGGTCTCCGGAAACCCAGAGGAAAGGGAAGAAAG

Nach Ligation der drei erhaltenen Sequenzen wurde eine PCR mit den Primern:

Felvgag-l (Seq.ID16): CGGATAAGGTACCATGGGCCAAACTATAACTACC

5 Felvgag-r (Seq.ID17): TTCTCAGAGCTCTTAGAGGAGAGTGGAGTTGGCGGGT

durchgeführt.

Primer für "env" WT:

envl (Seq.ID.18): CGGATAAGGTACCATGGCCAATCCTAGTCCACC

10 envr (Seq.ID19): AGTTCTCAGAGCTCTTAGGCTGTTTCAAGGAGGGCTT

Beispiel 2: Kodonoptimierung

Aus der Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) wurde die Kodon Benutzungstabelle für Katzen herausgesucht. Für jede Aminosäure der zwei WT-Sequenzen wurde das Kodon, das am häufigsten für diese Aminosäure kodiert, verwendet. Dabei gab es folgende Einschränkungen:

Wenn eine Aminosäure mehr als 3 mal nacheinander folgte, wurde ab der vierten Aminosäure das zweithäufigste Kodon verwendet. Dadurch sollte die plötzliche extreme Abnahme der tRNA vermieden werden und die Effektivität der Translation gesichert werden.

20 Um unkontrollierte immunstimulatorische Effekte auszuschließen, wurden Sequenzen mit einem C und einem darauf folgenden G vermieden.

Zur Vermeidung von Schnittstellen von Eco 31I, KpnI und SacI wurden alle Sequenzen der Basenfolge GAGCTC, GGTACC, GGTCTC und GAGACC durch Wahl alternativer, ebenfalls häufig benutzter, Kodons entfernt.

Beispiel 3: Klonierung von FeLVenv

Die Oligonukleotide wurde mit einer Länge zwischen 18 und 28 Basen bestellt (Tip-Molbiol). Insgesamt wurden 51 Oligonukleotide durch Annealing und Ligation miteinander verbunden. Der Überhang betrug 4 Basen. Es wurde darauf geachtet, dass die Überhänge nur einmal vorkamen und nicht palindromisch waren. Jedes einzelne Oligonukleotid wurde mit Strang und Gegenstrang hybridisiert, indem die beiden einzelnen Oligonukleotide (Strang und Gegenstrang) mit Kinasepuffer versetzt auf ca. 80°C erhitzt wurden und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Danach wurde ATP und Polynukleotidkinase (PNK) zugegeben und die Oligonukleotide wurden für eine Stunde phosphoryliert. Danach wurden im ersten Schritt jeweils benachbarte Oligonukleotide zusammengegeben und ligiert (Oligonukleotid 1+2, Oligonukleotid 3+4). Nach 1 h Ligation wurde ein Aliquot von dem Ligationsansatz der Oligonukleotide 1+2 und ein Aliquot vom Ligationsansatz 3+4 genommen und zusammengegeben. Ein Aliquot des letzten Ligationsansatzes wurde genommen und eine PCR mit flankierenden Primern durchgeführt. Entstand ein PCR mit der richtigen erwarteten Länge, wurde es mit TA-Cloning in den TOPO Vektor pCR 2.1 zwischenkloniert und die Sequenz kontrolliert. Dies erfolgte analog für die anderen Fragmente des kompletten Gens. 4 Fragmente wurden erhalten. Die einzelnen Fragmente wurden aus dem zwischenklonierten Plasmid mit Eco RI ausgeschnitten und dann nach Verdau mit Eco 31I mit Ligase ligiert. Das gesamte Ligationsprodukt richtiger Länge wurde mit Bam HI und Sac I verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor nach Gelextraktion in pMCV1.4 kloniert. Anschließend wurde die Sequenz durch Sequenzierung kontrolliert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-FeLVenv genannt.

Primer für die 4 zusammengesetzten Fragmente:

Fragment 1:

linker Primer (Seq.ID20): ATATTGGATCCCATGGCCAACCCCTCCC

rechter Primer (Seq.ID21) ATTATGGTCTCCTGCTGCTTCTTCCTGTCTGTGG

- 19 -

Fragment 2:

linker Primer (Seq.ID22): TAATAGGTCTCCAGCAGCAGACCTACCCCT

rechter Primer (Seq.ID23): TAATAGGTCTCTGTGAACAGGGCAATGGGGTCA

Fragment 3:

5 linker Primer (Seq.ID24): TATTTGGTCTCTTCACAGTGTCCAGGCAGGTGTC

rechter Primer (Seq.ID25): TATTAGGTCTCAGCTTGTGCTGGGGGGTGG

Fragment 4:

linker Primer (Seq.ID26): AATAAGGTCTCCAAGCTGACCATCTCTGAGGTGT

10 rechter Primer (Seq.ID27): ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTTCCAGC

gesamte Sequenz:

linker Primer (Seq.ID20): ATATTGGATCCCATGGCCAACCCCTCCC

rechter Primer (Seq.ID27): ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTTCCAGC

Beispiel 4: Klonierungsstrategie für LeadFeLVenv

- 15 Zur erfolgreichen Prozessierung des "env" Proteins wurde eine Signalsequenz (Leader Sequenz) vor die kodonoptimierte "env" Sequenz kloniert. Diese Signalsequenz wurde aus insgesamt 8 ODN, mit einer Länge zwischen 22-30 bp, durch Annealing und Ligation hergestellt. Aus dem letzten Ligationsschritt wurde eine PCR zur Amplifizierung der Leadersequenz durchgeführt.

- 20 -

Primer für die gesamte Signalsequenz:

linker Primer (Seq.ID28): ATTGCCGGTACCATGGAGTCCCCCACCACC

rechter Primer (Seq.ID29): ATCAGAGGTCTCCCATGCCAATGTCAATGGTGAAC

- Am 3'-Ende des PCR-Produktes wurde eine Eco31I Erkennungssequenz generiert,
5 die nach Verdau einen Überhang erzeugt, der revers komplementär zu dem am 5'-
Ende nach gleichem Verdau erzeugten Überhang des folgenden PCR-Produktes ist.

PCR für FeLVenv:

Dabei wurde am 5'-Ende der Sequenz eine Eco31I Erkennungssequenz generiert.

- 10 Verwendete Primer:

linker Primer (Seq.ID30): GATCTGGGTCTCCATGGCCAACCCCTC

rechter Primer (Seq.ID27): ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTTCCAGC

- Nach Verdau der beiden PCR-Produkte mit Eco31I wurden diese gereinigt und mit-
einander ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in eine PCR eingesetzt, bei der eine
15 Erkennungssequenz für KpnI am 5'-Ende sowie eine für SacI am 3'-Ende generiert
wurden.

Verwendete Primer:

linker Primer (Seq.ID28): ATTGCCGGTACCATGGAGTCCCCCACCACC

rechter Primer (Seq.ID27): ATTAAGAGCTCTCAGGCTGTTTCCAGC

- 21 -

Das PCR-Produkt wurde mit KpnI und SacI verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pMCV1.4 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-LeadFeLVenv genannt.

Beispiel 5: Klonierungsstrategie für LeadFeLVenvgp85

- 5 Es wurde das gesamte "env" Polyprotein bestehend aus gp70 und p15 kloniert. Dazu wurde mittels PCR aus dem Plasmid pMCV1.4-FelVenvp15 die p15 WT Sequenz amplifiziert und hinter die Sequenz des o.a. pMCV1.4-LeadFeLVenv kloniert.

Bei der Amplifizierung des p15 wurde am 5'-Ende eine Eco31I Erkennungssequenz generiert.

- 10 1. PCR:

Verwendete Primer:

linker Primer (Seq.ID31): AATTATGGTCTCGCAGTTCAGACAACTACAAATGGC

rechter Primer (Seq.ID32): AATTATGAGCTCTCAGGGCCTGTCAGGGTC

2. PCR:

- 15 Die Sequenz von LeadFeLVenv wurde amplifiziert. Dabei wurde am 3'-Ende eine Eco31I Erkennungssequenz generiert.

Verwendete Primer:

linker Primer (Seq.ID33): AATTATGGTACCATGGAGTCCCCCACCC

rechter Primer (Seq.ID34): TATAATGGTCTCAACTGGGCTGTTTCCAGCAGGGC

- 20 Nach Verdau der beiden PCR-Produkte mit Eco31I wurden diese miteinander ligiert. Das Ligationsprodukt wurde in eine PCR mit folgenden Primern eingesetzt:

- 22 -

linker Primer (Seq.ID33): AATTATGGTACCATGGAGTCCCCCACCC

rechter Primer (Seq.ID32): AATTATGAGCTCTCAGGGCCTGTCAGGGTC

Dabei wurde am 5'-Ende eine KpnI Erkennungssequenz, am 3'-Ende eine SacI Erkennungssequenz generiert. Nach Verdau des PCR-Produktes mit KpnI und SacI wurde dieses in den ebenso geschnittenen pMCV1.4 ligiert und kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-LeadFeLVenvgp85 genannt.

Beispiel 6: Spleiß-Signal Optimierung des LeadFeLVenvgp85 (-spleiß):

Die DNA-Sequenz des LeadFeLVenv wurde unter http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html auf mögliche Spleiß-Signalsequenzen (splice-sites) überprüft. Zwischen den Basen 100 und 140 wurde eine splice-site mit einer 97% Wahrscheinlichkeit erkannt. Nach Austausch der Base 119 (von A nach G = AS-Austausch von Gln nach Arg) wurde keine potentielle splice-site mehr erkannt (untere Grenze = 40% Wahrscheinlichkeit). Die Erzeugung und Klonierung der mutierten Sequenz wurden folgendermaßen durchgeführt:

15 PCR zur Erzeugung der mutierten Sequenz:

Zunächst wurde mittels PCR ein Fragment (1), bestehend aus den Basen 1 – 123 des LeadsynFeLVenv amplifiziert. Der verwendete vorwärts-Primer generiert am 5'-Ende des PCR-Produktes die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym KpnI.

Die Sequenz des rückwärts-Primer wurde so gewählt, dass das PCR-Produkt die Mutation (Base 119=G) aufweist. Zusätzlich generiert die PCR die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym Eco31I-Site am 3'-Ende des PCR-Produktes. Grundsätzlich erzeugt Eco31I einen 4 Basen 5'-Überhang der Basen 2-5 downstream der Erkennungssequenz.

Der 4 Basen 5'-Überhang, der nach Verdau des PCR-Produktes mit Eco31I am 3'-Ende des Fragment 1 entsteht, entspricht den Basen 120 – 123 der Sequenz des LeadFeLVenv. Diese Sequenz wiederum entspricht dem Überhang, der auch ent-

- 23 -

steht, wenn LeadFeLVenv mit dem Restriktionsenzym BgLI^I geschnitten wird, da die Basen 119 – 124 des LeadFeLVenv die Erkennungssequenz von BgLI^I darstellen.

Aus dem Konstrukt pMCV1.4-LeadFeLVenv wird somit zunächst mittels KpnI und BgLI^I die Basen 1 – 123 ausgeschnitten.

- 5 Nach Verdau des PCR-Produktes Fragment 1 (mit Mutation der Base 119 = G) mit KpnI und Eco31I kann dieses in den mit KpnI und BgLI^I geschnittenen und gereinigten pMCV1.4-LeadFeLVenv ligiert und kloniert werden. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-FeLVenvgp70 (-spleiß) genannt.

verwendete Primer:

- 10 linker Primer (Seq.ID28): 5'-ATTGCCGGTACCATGGAGTCCCCACCCACC

rechter Primer (Seq.ID35): 5'-ATATTAGGTCTCAGATCCGGGGGGGGGAGGG

Analog dazu wurde das PCR-Produkt Fragment 1 in den mit KpnI und BgLI^I geschnittenen und gereinigten pMCV1.4-LeadFeLVenvgp85(-spleiß) ligiert und kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pMCV1.4-FeLVenvgp85(-spleiß) genannt.

- 15 Beispiel 7: Klonierungsstrategie für FeLVgag:

Die Klonierung von FeLVgag erfolgte entsprechend der unter 3 beschriebenen Vorgehensweise. Die Sequenz wurde über Oligonukleotide, die zunächst zu drei einzelnen Fragmenten annealt und ligiert wurden, hergestellt. Die Sequenz wurde aus insgesamt 2 x 31 Oligonukleotiden (Vorwärts- und Rückwärtsstrang) zusammengesetzt. Die Fragmente wurden als Template in eine PCR eingesetzt und mit folgenden Primern amplifiziert:

Fragment 1:

linker Primer (Seq.ID36): ATATTGGTCTCAGGAGAGGGACAAGAAGAG

rechter Primer (Seq.ID37): AATATGGTCTCTCAGCCTGCTGGCGATGGGGC

- 24 -

Fragment 2:

linker Primer (Seq.ID38): ATTATGGTCTCTGCACCTGAGGCTGTACAGGC

rechter Primer (Seq.ID39): AATATGGTCTCGGTGCTCCCTGCCGGCGGGGGTGCA

Fragment 3:

5 linker Primer (Seq.ID38): ATTATGGTCTCTGCACCTGAGGCTGTACAGGC

rechter Primer (Seq.ID40): AATATGGTCTCTCTCCTCCTGCCTCTGC

Primer für das gesamte Fragment:

linker Primer (Seq.ID36): ATATTGGTCTCAGGAGAGGGACAAGAAGAG

rechter Primer (seq.ID40): AATATGGTCTCTCTCCTCCTGCCTCTGC

- 10 Fragment 1, 2 und 3 wurden in den TOPO-Vektor pCR 2.1. zwischenkloniert, anschließend mit Eco 31I verdaut und extrahiert. Das Ligationsprodukt aus 1, 2 und 3 wurde mit KpnI und SacI verdaut und in pMCV 1.4 kloniert. Das entstandene Plasmid wurde pCMV1.4-FeLVgag genannt.

Beispiel 7: Transfektion der Zellen, Expressionsnachweis:

- 15 Feline Zellen der f3201 Zelllinie wurden mit den Plasmiden, pMCV1.4-FeLVenvgp85(-spleiß), pMCV1.4-FeLVenvgp70(-spleiß), FeLVgag und den WT enthaltenen Plasmiden pMOK für "env" und "gag" mittels Elektroporation bei 250 V und 1050µF transfiziert.

- 20 Der Nachweis der exprimierten Proteine wurde mit der Western Blot Methode geführt. Für den Nachweis dienten monoklonale Mausantikörper. Positiv-Kontrolle: mit FeLV A infizierte Zellen der f3201 Zelllinie.

Beispiel 8: Herstellung von peptidgekoppelten Midge:

Die Plasmide pMCV1.4-FeLVenvgp85(-spleiß), pMCV1.4-FeLVenvgp70(-spleiß) und pMCV1.4-FeLVgag wurden mit dem Restriktionsenzym Eco31I über Nacht bei 37°C vollständig verdaut. Durch den Restriktionsverdau wurden zwei DNA-Fragmente erzeugt. Das eine bestand aus dem Kanamycin-Resistenzgen, sowie anderen zu Propagierung des Plasmides in Bakterien notwendigen Sequenzen. Das andere Fragment bestand aus den Sequenzen die Bestandteil der Midge-DNA werden sollten: enhanced CMV-Promotor, chimäres Intron, der entsprechenden Gensequenz und der Polyadenylierungssequenz aus SV 40. Mittels des Enzyms T4-DNA-Ligase wurden die 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotide (TIBMOlBiol, Berlin) 5' -PH- GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC -3' und 5' PH-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' in Anwesenheit des Restriktionsenzymes Eco31 I über Nacht bei 37°C an das die Midge-DNA bildende DNA Fragment ligiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch an Nukleinsäuren wurde mit dem Enzym T7-DNA-Polymerase behandelt. Die Midge-DNA wurde durch Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und mit Isopropanol gefällt (vgl. EP 0 941 318 B1)

Herstellung der peptid-gekoppelten ODN:

Das NLS-Peptid PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-d(GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC, wobei xT aminomodifizierte Thyminbase mit C₂ – Aminolinker bezeichnet) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl₂, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS-gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der Midge-NLS Konstrukte wie zuvor beschrieben eingesetzt.

Beispiel 9: Antikörpertest in Mäusen

Es wurden fünf Impfgruppen zu je sechs BALB/c Mäusen gebildet (siehe Tabelle 1). Grundantigen in allen Gruppen (mit Ausnahme der Kontrollgruppen) waren die optimierten Sequenzen des "env" Proteins mit und ohne immunomodulierendem Protein p15. Die kodierende Sequenz und der Zytomegalo-Virus Promotor (CMV), der der Sequenz vorangestellt ist, werden als lineare Doppelstrangmoleküle entsprechend Bsp.8 verwendet. Als Kontrollen dienten PBS Puffer, herkömmlicher Impfstoff (Leucogen) und der WT des "env" Proteins. Nach der Erstimmunisierung (50 µg DNA, 1mg/ml, i.d.) erfolgte eine Zweitimmunisierung (Boost) am 15. Tag. Blutentnahmen erfolgten am 14., 28. Und 42. Tag. Die Blutproben wurden auf spezifische Antikörper gegen "env" getestet.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Impfgruppen

Gr.	Mäuse	Verwendetes Antigen	Fragestellung
1	6	Leucogen	Positivkontrolle
2	6	PBS-Puffer	Negativkontrolle
3	6	FeLVenvgp85(-spleiß)	Antikörper bestimmen
4	6	FeLVenvgp70(-spleiß)	Antikörper bestimmen
5	6	WT "env"	Positivkontrolle

Die Ergebnisse sind in Figur 3 gezeigt.

15 Beispiel 10a: Immunisierung von Katzen

Zum Testen, ob die synthetischen Sequenzen in der Lage sind, in Katzen eine humorale und zelluläre Immunantwort hervorzurufen, wurde folgendes Impfregime (Tabelle 2) formuliert:

Tabelle 2: Zusammensetzung der Impfgruppen

Gr.	Katzen	Verwendetes Antigen	Fragestellung
1	5	FeLVenvgp85(-spleiß) FeLVgag	Antikörper-u. Zytokinstatus bestimmen
2	5	FeLVenvgp70(-spleiß) FeLVgag	Antikörper-u. Zytokinstatus bestimmen, Vergleich zu Gruppe 1
3	2	PBS Puffer	Negativkontrolle
4	3	Leucogen	Positivkontrolle

Die Katzen der ersten beiden Gruppen werden zweimal mit einer Gesamtmenge von jeweils 600µg DNA, gelöst in PBS Puffer, immunisiert. Die peptidgekoppelten Expressionskonstrukte werden per intradermaler Injektion in den Nacken verabreicht. Die Immunantwort wird über die Dauer von 12 Wochen verfolgt. Die Zweitimmunisierung erfolgt in Woche 4. Durch Bestimmung des Zytokinstatus aus den wöchentlich genommenen Blutproben, sollen Aussagen über die Richtung der Immunantwort (Th1, Th2) getroffen werden. Dabei wurde IL-4 als Indikator einer TH2; IL-2 und Interferon-gamma als Indikator einer vorwiegend TH1 gerichteten Immunantwort bestimmt. Der Impfstoff Leucogen enthält rekombinantes "env" Protein und wird als Positivkontrolle eingesetzt.

Antikörper gegen die eingesetzten Antigene wurden mittels Westernblot und ELISA-Verfahren bestimmt.

Die Menge der mRNA der Zytokine IL-2, IL-4 sowie Interferon-gamma wurde mittels real-time PCR Verfahren bestimmt.

Beispiel 10b: *in vivo* Ergebnisse nach Immunisierung von Katzen nach dem in Tabelle 2 beschriebenen Impfregime.

Der semiquantitative Nachweis der Antikörper gegen das „env“ Protein erfolgte mittels Westernblot. Getestet wurden Plasmaproben der Katzen aus Versuchswoche 0 und 12. In Woche 0 wurden erwartungsgemäß keine Antikörper gegen das „env“

- 28 -

nachgewiesen. Bei den in der Tabelle 3 aufgeführten schwachen Banden (+) handelt es sich um unspezifische Banden. In Woche 12 zeigten alle Tiere der Gruppen 1, 2 und 4 mit Ausnahme einer Katze eine deutliche Antikörperantwort. Diese Ergebnisse in der Zieltierart bestätigen jene aus dem Vorversuch in Mäusen (vgl. Beispiel 9).

Dabei bedeuten: +++ sehr starke Bande,
 ++ starke Bande,
 + sichtbare Bande,
 (+) schwache Bande.

- 10 Die Stärke der Banden repräsentieren die Konzentration der Antikörper im Plasma der immunisierten Katzen.

Tabelle 3: Bestimmung der humoralen Immunantwort gegen FeLVenv-Protein

Gr.	Verwendetes Antigen	Katzen	Woche 0	Woche 12
1	FeLVenvgp85(-spleiß) FeLVgag	1	-	+++
		2	-	++
		3	-	++
		4	-	++
		5	-	++
2	FeLVenvgp70(-spleiß) FeLVgag	1	-	+++
		2	(+)	+++
		3	-	++
		4	-	++
		5	-	+
3	PBS Puffer	1	(+)	-
		2	(+)	(+)
4	Leucogen	1	-	+++
		2	-	+++
		3	-	(+)

Beispiel 11: Überprüfung des Impfschutzes durch Belastungsinfektion

Um zu überprüfen, ob die erreichte hohe Antikörperproduktion auch tatsächlich zu einem Schutz gegen die Infektion mit dem FeL-Virus in der Lage ist und somit die Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Impfstoffes überprüft werden konnte, schloss sich ein Experiment mit Belastungsinfektion an. Dafür wurden vier Gruppen mit jeweils 10 Katzen zweimal (Tag 0 und Tag 21) mit den entsprechenden Konstrukten intradermal mit einem nadelfreien Injektionsgerät geimpft (Tabelle 4). Als Expressionskonstrukte wurden beschriebene mit dem NLS-Peptid gekoppelte Midge Vektoren eingesetzt. Am Tag 21, 22 und 23 nach der letzten Impfung wurden die Katzen mit lebendem FeL-Virus (Rickard Stamm, > 10e6 focus-forming units/ml) durch eine Belastungsinfektion infiziert. Die Wirksamkeit des Impfstoffes wurde danach beurteilt, ob die Katzen nach der Belastungsinfektion geschützt waren. Als geschützt gelten Katzen, die keine Viruspartikel im Serum (seronegative Katzen) und keine Virus-DNA in ihren Blutzellen aufweisen. Zum Nachweis von Viruspartikeln wurde das Katzenserum auf Vorhandensein des Antigens p27 mittels ELISA getestet. Die Menge an integrierter Virus-DNA, die sogenannte Provirus-DNA, wurde mittels eines Taqman PCR Verfahrens überprüft. Folgendes Impfregime wurde formuliert:

Tabelle 4:

Gr.	Verwendetes Antigen	DNA-Dosis [µg]	Anzahl seronegativer Katzen 105 Tage nach der Belastungsinfektion
1	PBS Puffer	-	0
2	FeLVgag	2 x 100	2
3	FeLVenvgp70(-spleiß)	2 x 50	4

Als Negativkontrolle wurde PBS Puffer eingesetzt.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Serumuntersuchung der Katzen hinsichtlich des Vorhandenseins des Virusproteins p27. Dieser Test ist ein allgemein anerkannter

- 30 -

Test, um die FeLV Virämie zu diagnostizieren. Parallel dazu wurden weiße Blutzellen derselben Katzen auf das Vorhandensein Proviralet-DNA getestet (Daten nicht gezeigt). Alle Virusprotein-freien Katzen waren auch frei von Proviralet-DNA.

- 5 Da beide Testsysteme unterschiedliche Stadien der Virusentwicklung im Körper nachweisen, kann bei zweifachem negativen Ergebnis davon ausgegangen werden, das sich das Virus nicht im Körper der Tiere vermehren konnte, was mit einem erreichten Schutz gleichzusetzen ist.

In den Gruppen 2 und 3 konnte ein Teil der Katzen gegen die Infektion mit FeLV geschützt werden.

- 10 In Gruppe 2 waren 2 von 10 Katzen sowohl frei von Virusprotein als auch frei von proviralet DNA. Dieser erreichte Impfschutz beruhte auf die Verabreichung des erfindungsgemäßen Impfstoffs (Seq.ID 5).

- In der Gruppe 3 konnten 40% der Tiere mit dem erfindungsgemäßen Impfstoff (Seq. ID 8) vor der Infektion mit dem FeL-Virus geschützt werden. Das ist eine signifikante
15 Reduktion infizierter Katzen im Vergleich zu Gruppe 1.

- Bei den Tieren konnte ebenfalls weder Virusprotein noch Provirus-DNA in den Serum- und Blutproben nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, das zum Schutz der 4 Katzen in Gruppe 3 die sehr geringe Dosis von 50µg je Injektion ausreichend war, um die Katzen zu schützen. Das ist von Vorteil, da die zu verabreichende DNA-
20 Konzentration gering ist und somit die Herstellungskosten des Impfstoffes rapide gesenkt werden.

Alle Tiere der Gruppe 1 (Kontrollgruppe) zeigten Viruspartikel im Blut, d.h., sie waren nicht geschützt und voll empfänglich für die Belastungsinfektion.

- 25 Während des gesamten Immunisierungsversuchs wurden weder Nebenwirkungen inform von lokalen Reizungen an den Injektionsstellen, noch Störungen des Allgemeinbefindens der Versuchstiere beobachtet.

Patentansprüche

1. DNA-Expressionskonstrukt zur Expression von Genprodukten des Feline Leukosevirus (FeLV) in Katzenzellen, bestehend aus einer in Feliden operablen Promotorsequenz und mindestens einer Nukleotidsequenz, die verwandt ist mit einer für ein originäres Strukturprotein („gag“) und/oder Membranprotein („env“) des FeLV kodierenden Wildtyp-Nukleotidsequenz, wobei besagte Nukleotidsequenz des FeLV verändert ist und keine offenen oder versteckten Splice-Donor und/oder Akzeptorsequenzen aufweist und für ein mit dem originären Strukturprotein („gag“) und/oder dem originären Membranprotein („env“) des FeLV hochgradig homologes aber nicht identisches Protein oder einen hochgradig homologen aber nicht identischen Teil derselben kodiert.
2. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, kodierend für mit dem originären Strukturprotein („gag“) und/oder dem originären Membranprotein („env“) des FeLV hochgradig homologe aber nicht identische Proteine mit einer Homologie zum korrespondierenden Wildtyp von wenigstens 98%.
3. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, enthaltend die für das „gag“ verwandte Strukturprotein kodierende im Zuge der Kodon-Optimierung mutagenisierte Nukleotidsequenz Seq.ID5.
4. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, enthaltend die für das env-gp85 verwandte Membranprotein kodierende im Zuge der Kodon- und Spleiß-Optimierung mutagenisierte Nukleotidsequenz Seq.ID7.
5. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1, enthaltend die für das env-gp70 verwandte Membranprotein kodierende im Zuge der Kodon- und Spleiß-Optimierung mutagenisierte Nukleotidsequenz Seq.ID8.
6. DNA-Expressionskonstrukt nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Struktur- und/oder Membranproteine ganz oder teilweise durch die entsprechenden Nukleotidsequenzen kodiert werden.

- 32 -

7. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Expressionskonstrukt ein Plasmid ist.
8. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die immunisierenden Polynukleotidsequenzen als Expressionskonstrukte vorliegen, die aus kovalent geschlossenen linearen Desoxyribonukleinsäuremolekülen bestehen, welche einen linearen Doppelstrangbereich aufweisen und wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge durch kurze einzelsträngige Schleifen aus Desoxyribonukleinsäurenukleotiden verknüpft sind, und wobei die doppelstrangbildenden Einzelstränge nur aus der kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines im zu impfenden Tier operablen Promotors und einer Terminatorsequenz besteht.
9. DNA-Expressionskonstrukt nach wenigstens einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Expressionskonstrukt mit einem oder mehreren Peptiden kovalent verknüpft ist.
10. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 8, wobei das Peptid aus 3 bis 30 Aminosäuren besteht, von denen mindestens die Hälfte basische Aminosäuren aus der Gruppe Arginin und Lysin kommen.
11. DNA-Expressionskonstrukt nach Anspruch 9, wobei das Peptid die Aminosäuresequenz PKKKRKV (Polin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) aufweist.
12. Arzneimittel, insbesondere eine Vakzine, zur Erzeugung einer präventiven und/oder therapeutischen Immunität bei Feliden, insbesondere der Katze, enthaltend ein DNA-Expressionskonstrukt nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11.
13. Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß Seq.ID6, welches ein mit dem originären Strukturprotein („gag“) des Felinen Leukosevirus (FeLV) hochgradig homologes Protein darstellt.

- 33 -

14. Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß Seq.ID9, welches ein mit dem originären Membranprotein gp85 („env“) des Felines Leukosevirus (FeLV) hochgradig homologes Protein darstellt.
- 5 15. Protein mit der Aminosäuresequenz gemäß Seq.ID10, welches ein mit dem originären Membranprotein gp70 („env“) des Felines Leukosevirus (FeLV)hochgradig homologes Protein darstellt.
16. Monoklonaler Antikörper gegen ein Protein gemäß Anspruch 13 bis 15.
17. Polyklonale Antikörper gegen ein Protein gemäß Anspruch 13 bis 15.
- 10 18. Kit zur Diagnose von Infektionen bei Katzen mit dem Felines Leukosevirus (FeLV) , enthaltend ein oder mehrere Antikörper gemäß der Ansprüche 17 und 18.

Fig. 1

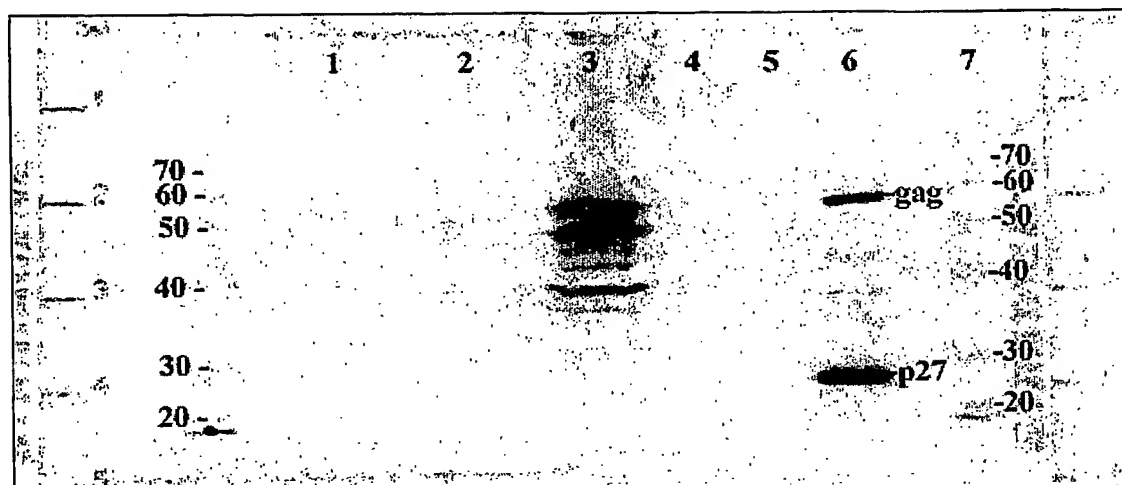


Fig. 2

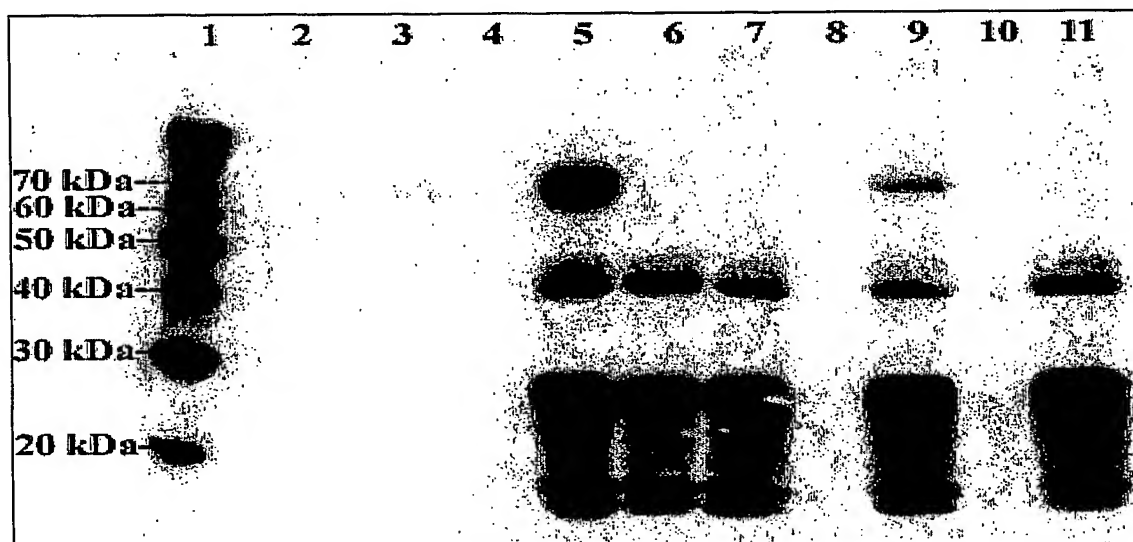


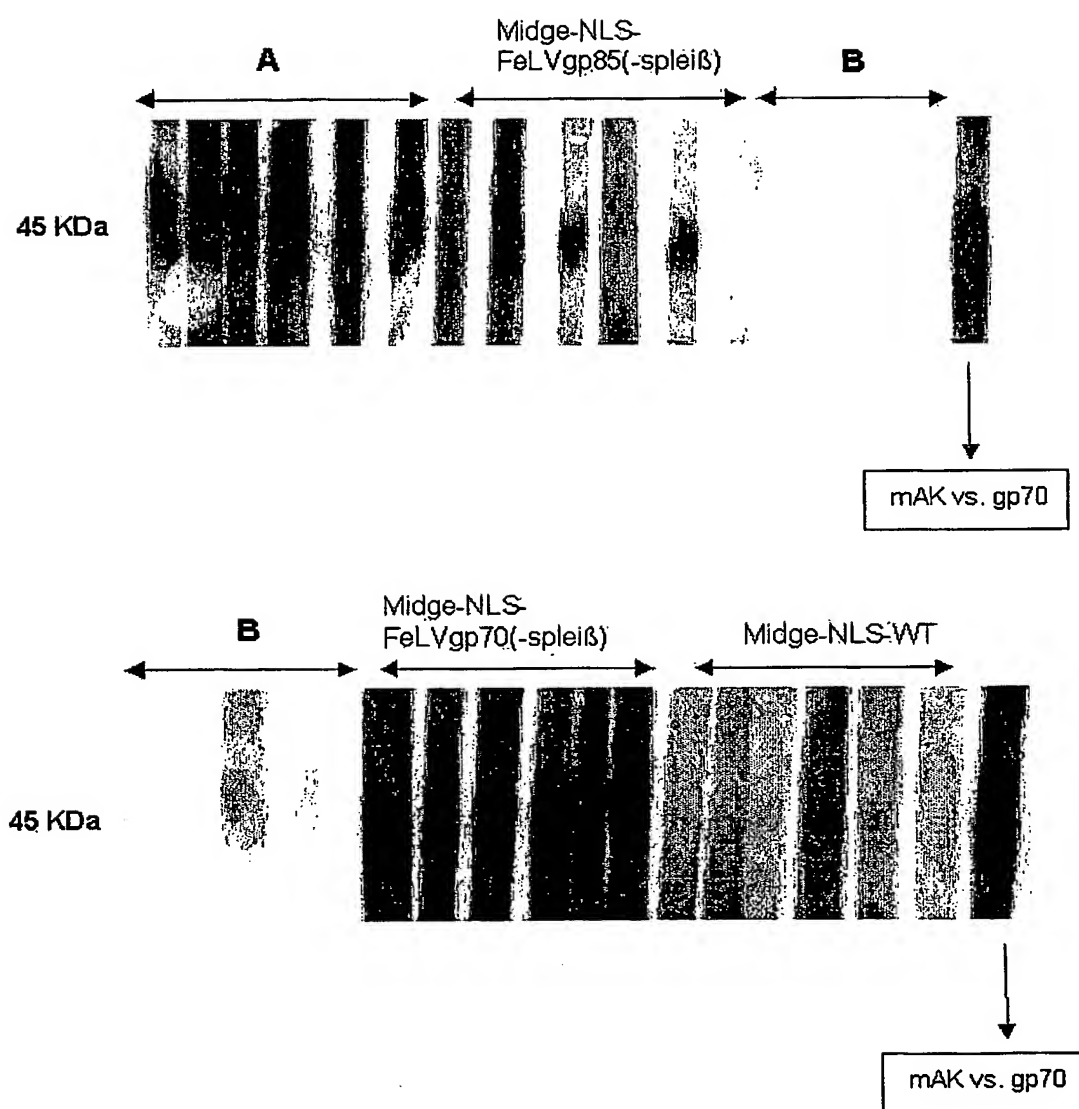
Fig. 3

Fig. 4: DNA-Sequenzvergleich: Wildtyp „gag“-Gen (Seq.ID2) vs. mutagenisiertes „gag“-Gen (Seq.ID5)

SeqID2	1	ATGGGCCAAACTATAACTACCCCCTTGAGCCTCACCCCTCAACCACTGGTCTGAGGTTTCAG
SeqID5	1	""""""G""C""C""C""""""C""""""G""""G""""""AGC""""G""""
SeqID2	61	GCACGGGCCCCGTAATCAGGGTGTCTGAAGTCCGGAAAAAGAAATGGATTACACTGTGTGAA
SeqID5	61	""CA""""A"G""C""""C""G""G""GA""""G""""G""""C""C""""C""G
SeqID2	121	GCCGAATGGGTAATGATGAATGTAGGTTGGCCCCGAGAAGGAACCTTTCACCATTGACAAT
SeqID5	121	""""G""""G""""""C""G""C""""A"G""G""C""C""""C""""C""""C
SeqID2	181	ATTTACACAGGTCGAGGAGAGAATCTTCGCCCCGGGGCCATATGGACACCCAGATCAAATC
SeqID5	181	""CAGC""""G""""""G""""""C""C""C""C""C""C""C""C""G""
SeqID2	241	CCTTATATTACCACGTGGAGATCCCTAGCCACAGACCCCCCTCCATGGGTTTCGCCCATTC
SeqID5	241	""C""C""C""""C""""GAG""G""""C""""C""""C""C""""GA"G""C""
SeqID2	301	CTACCCCCTCCTAAGCATCCCAGGACAGATCCTCCCGAGCCTCTTTTCGCCGCAACCTCTT
SeqID5	301	""G""""C""C""""C""""C""C""C""C""C""C""C""GAGC""C""G""C""G
SeqID2	361	GCGCCGCAACCC_TC_TTCCCCCA_CCCCGTCCTCTACCCCGTTCTCCCCAAACCAGAC
SeqID5	361	""C""C""G""AG"GCC""""T"AG"AG""G""""G""G""G""G""C""
SeqID2	418	CCCCCAAGGCGCCTGTATTACCACCCAATCCTTCTTCCCCTTTAATTGATCTCTTAACA
SeqID5	421	""""""C""C""GC"G""C""""C""CAGCAG""CC"G""C""C""GC"G""C
SeqID2	478	GAAGAGCCACCTCCCTATCCTGGGGGTCACGGGCCAACACCGCCGTAGGCCCCTAGAACC
SeqID5	481	""G""""C""C""""C""C""C""C""C""C""C""C""CAGC""C""G""
SeqID2	538	CCAACTGCCTCCCCGATTGCCATCCGGCTGCGAGAACGACGAGAAAATCCAGCTGAGAAA
SeqID5	541	""C""C""AG""C""C""G"A""""A"G""GA"GA"G""G""C""C""C""G
SeqID2	598	TCTCAAGCCCTCCCTTAAGGGAAGACCCAAACAACAGACCCAGTACTGGCCATTCTCG
SeqID5	601	AGC""G""""G""""C"G""""G""""C""""G""""G""""G""""C""AGC
SeqID2	658	GCCTCTGACCTGTACAATTGGAAATTGCATAA_CCCCCCTTCTCCAGGACCCAGTGGC
SeqID5	661	""AGC""""C""""GC""C""C""""C""""C""""C""""C""""C""""C""
SeqID2	717	CCTAACTAACCTAATTGAGTCCATTTTAGTGACACATCAGCCAACCTGGGACGACTGCCA
SeqID5	720	""G""C""""G""C""AG""CC"G""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""
SeqID2	777	ACAGCTCTTACAGGCTCTCCTGACGGCAGAGGAGAGACAAAGGGTCTCCTTGAAGCCCCG
SeqID5	780	G""""GC"G""""C""G""""C""C""""G""G""""G""G""G""G""A"
SeqID2	837	AAAGCAAGTTCCAGGCGAGGACGGACGGCCAACCCAGCTGCCCAATGTCGTTGACGAGGC
SeqID5	840	G""""G""G""C""""C""""CA""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""
SeqID2	897	TTTCCCCTTGACCCGTCCCAACTGGGATTTTGTACGCCGGCAGGTAGGGAGCACCTACG
SeqID5	900	C""C""C""A"G""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""
SeqID2	957	CCTTTATCGCCAGTTGCTGTTAGCGGGGCTCCGCGGGGCTGCAAGACGCCCCACTAATTT
SeqID5	960	G""G""CA"G""C""C""C""G""C""C""C""GA"G""C""C""C""GA"G""C""C""C""
SeqID2	1017	GGCACAGGTAAAGCAAGTTGTACAAGGGAAGAGGAAACGCCAGCCTCATTCTTAGAAAG
SeqID5	1020	""C""""G""""G""G""G""G""C""G""""G""A""C""AGC""C""G""G""
SeqID2	1077	ATTAAAAGAGGCTTACAGAATGTATACTCCCTATGACCCTGAGGACCCAGGGCAGGCTGC
SeqID5	1080	GC"G""G""C""C""G""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""CA"
SeqID2	1137	TAGTGTTATCCTGTCTTTATCTACAGTCTAGCCCCGACATAAGAAATAAGTTACAAAG
SeqID5	1140	C""C""G""""AG""C""""AGC""C""C""C""G""C""C""G""G""

SeqID2	1197	GCTAGAAGGCCTACAGGGGTTACACTGTCTGATTTGCTAAAAGAGGCAGAAAAGATATA
SeqID5	1200	""G""G""""G""""C""""C""AGC""CC""""G""G""""C""G""""C""
SeqID2	1257	CAACAAAAGGGAAACCCAGAGGAAAGGGAAGAAAGATTATGGCAGCGGCAGGAAGAAAG
SeqID5	1260	""""G""""G""A""C""""G""""G""G""GC""G""""A""""G""G""
SeqID2	1317	AGATAAAAAGCGCCATAAGGAGATGACTAAAGTTCTGGCCACAGTAGTTGCTCAGAATAG
SeqID5	1320	G""C""G""A""G""C""""C""G""G""""C""G""G""C""C""C""
SeqID2	1377	AGATAAGGATAGAGGGGAAAGTAACTGGGAGATCAAAGGAAAATACCTCTGGGGAAAGA
SeqID5	1380	G""C""""C""G""C""G""C""G""""C""C""G""""G""C""C""C""G""
SeqID2	1437	CCAGTGTGCCTATTGCAAGGAAAAGGGACATTGGGTTCGCGATTGCCCCGAAACGACCCCG
SeqID5	1440	""""C""""C""""G""""C""C""""GA""G""C""""C""GA""G""A""
SeqID2	1497	GAAGAAACCCGCCAACTCCACTCTCCTCTAA
SeqID5	1500	""""G""""AG""C""G""G""G

Fig. 5 DNA-Sequenzvergleich Wildtyp „env“ gp 70 (Seq.ID 11) vs. mutagenisiertes „env“-Gen (Seq.ID8)

SeqID11	1	ATGGAAAGTCCAACGCACCCAAAACCCCTCTAAAGATAAGACTCTCTCGTGGAACCTTAGCG
SeqID8	1	""""GTCC""C""C""""C""G""""C""G""C""""C""G""C""""A""G""T""
SeqID11	61	TTTCTGGTGGGGATCTTATTTACAATAGACATAGGAATGGCCAATCCTAGTCCACACCAA
SeqID8	61	""C""""""C""C""C""G""C""C""T""""T""C""""""C""C""TCC""C""C""GG
SeqID11	121	ATATATAATGTAACCTTGGGTAATAACCAATGTACAAACTAACACCCAAGCTAACGCCACC
SeqID8	121	""C""C""""G""C""""G""C""""G""G""C""""G""C""T""""
SeqID11	181	TCTATGTTAGGAACCTTAACCGATGCCTACCCTACCCTACATGTTGACTTATGTGACCTA
SeqID8	181	""""C""G""C""C""G""A""""A""""C""""G""""G""C""G""""G""
SeqID11	241	GTGGGAGACACCTGGGAACCTATAGTCCATAACCCAACCAATGTAAAACACGGGGCACGT
SeqID8	241	""""G""""""""G""C""TCCG""G""""C""""""G""G""T""""CA""G
SeqID11	301	TACTCCTCCTCAAAATATGGATGTAAACTACAGATAGAAAAAACAGCAACAGACATAC
SeqID8	301	""""""C""G""""C""C""G""C""""C""G""G""G""G""C""C""
SeqID11	361	CCCTTTTACGTCTGCCCCGGACATGCCCCCTCGTTGGGGCCAAAGGGAACACATTGTGGA
SeqID8	361	""""C""T""G""""T""C""""""C""C""C""C""C""C""C""G
SeqID11	421	GGGGCACAAAGATGGGTTTTGTGCCGCATGGGGATGTGAGACCACCGGAGAAGCTTGGTGG
SeqID8	421	""""C""G""""C""C""""T""C""""C""A""""A""G""G""C""""
SeqID11	481	AAGCCACCTCCTCATGGGACTATATCACAGTAAAAGAGGGAGTAGTCAGGACAATAGC
SeqID8	481	""""""C""C""""C""G""G""G""C""CTCCTC""""""CTC"
SeqID11	541	TGTGAGGGAAAATGCAACCCCTGGTTTTGCAGTTCACCCAGAAGGGAAGACAAGCCTCT
SeqID8	541	""""C""G""""G""C""""C""C""C""C""C""C""C""C""C"
SeqID11	601	TGGGACGGACCTAAGATGTGGGGATTGCGACTATACCGTACAGGATATGACCCTATCGCT
SeqID8	601	""""T""C""C""""""C""C""A""G""G""A""G""C""C""C""T""C
SeqID11	661	TTATTACGGTGTCCCGGCAGGTATCAACCATTACGCCGCCTCAGGCAATGGGACCAAAC
SeqID8	661	C""G""""A""""A""""G""C""C""C""C""C""C""C""C""C""C""
SeqID11	721	CTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCATCCCGACAATCTCAAACAGGGTCCAAAGTGGCG
SeqID8	721	""G""GC""G""""C""G""G""C""A""G""G""C""G""C""G""G""C"
SeqID11	781	ACCCAGAGGCCCAACGAATGAAAGCGCCCCAAGGTCTGTTGCCCCACCACCATGGGT
SeqID8	781	""""G""C""C""G""C""G""C""C""C""C""C""C""C""C""C"
SeqID11	841	CCCAAACGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAATTTAGTACAAGGGACATACCTAGCC
SeqID8	841	""""GA""""C""A""G""C""C""G""C""CC""G""G""G""C""C""G""
SeqID11	901	TTAAATGCCACCGACCCCAACAAACTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTGGTTTCTCGACCA
SeqID8	901	C""G""""A""""G""C""G""C""G""C""G""C""G""C""G""C""G"
SeqID11	961	CCCTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACCTACAGCAACCAACAAACCCCCCCCCA
SeqID8	961	""C""T""G""C""C""C""G""C""C""C""C""C""C""C""C""C"
SeqID11	1021	TCCTGCCTATCTACTCCGCAACACAACTAATATATCTGAAGTATCAGGGCAAGGAATG
SeqID8	1021	""""G""C""C""C""G""G""G""G""C""C""C""G""G""T""C""G""C""
SeqID11	1081	TGCATAGGGACTGTTCTTAAACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACACAACAGGGACAT
SeqID8	1081	""""T""C""A""G""C""G""C""C""C""C""C""C""C""G""C""C""C"
SeqID11	1141	ACAGGGGCGCACTATCTAGCCGCCCCCAACGGCACCTATTGGGCCTGTAACACTGGACTC
SeqID8	1141	""""C""C""C""G""T""T""""T""""C""C""C""C""C""A""C""G"

SeqID11	1201	ACCCCATGCATTTCCATGGCGGTGCTCAATTGGACCTCTGATTTTGTGTCTTAATCGAA
SeqID8	1201	" " " " "C" " " " "C" " " " " "T" " " " "G" " " " " " " " " " "C" " " " " " " " " " "GC" "G" "T" "G
SeqID11	1261	TTATGGCCCAGAGTGACTTACCATCAACCCGAATATGTGTACACACATTTTGCCAAAGCT
SeqID8	1261	C"G" " " " " " "G" " " " " "C" " " " " "C" " "G" "T" "G" " " " " " " " " " "C" " "C" " " " " " " "G" " " "
SeqID11	1321	GTCAGGTTCCGAAGAGAACCAATATCACTAACGGTTGCCCTTATGTTGGGAGGACTTACT
SeqID8	1321	" "G" " " " " "A" "G" " "G" " "G" " "C" " "C" " "C" " "G" " "A" " "G" " " " " " "G" " " "C" " " " "G" " "C" " "G" " "A
SeqID11	1381	GTAGGGGGCATAGCCGCGGGGGTCGGAACAGGGACTAAAGCCCTCCTTGAAACAGCCTGA
SeqID8	1381	" "G" " " " " " " "T" " "T" " "T" " " " " "G" " " " " " "C" " " " " " "C" " "C" " "G" " " " " "G" " "G" " " " " " " " " " " "

Fig. 6 DNA-Sequenzvergleich Wildtyp „env“-Gen (Seq.ID1) vs. mutagenisiertes „env“-Gen (gp85) (Seq.ID7)

SeqID1	1	ATGGAAAGTCCAACGCACCCAAAACCCCTCTAAAGATAAGACTCTCTCGTGGAACCTTAGCG
SeqID7	1	" " " " "GTCC" "C" "C" " " " " "C" " " "G" " " " "C" " " "G" " " " "C" " " " " "C" " " " " "A" "G" "T" "
SeqID1	61	TTTCTGGTGGGGATCTTATTACAAATAGACATAGGAATGGCCAATCCTAGTCCACACCAA
SeqID7	61	" "C" " " " " " " "C" " " "C" "G" " "C" " "C" " "T" " " " " "T" " "C" " " " " " " "C" " "CTCC" "C" "C" "GG
SeqID1	121	ATATATAATGTAACCTTGGGTAATAACCAATGTACAACTAACACCCAAGCTAACGCCACC
SeqID7	121	" "C" " "C" " " " " "G" " "C" " " " " "G" " "C" " " " " " "G" "G" " "C" " " " " " "G" " "C" " "T" " " " " "
SeqID1	181	TCTATGTTAGGAACCTTAACCGATGCCTACCCTACCCTACATGTTGACTTATGTGACCTA
SeqID7	181	" " " " "C" "G" " "C" " " "C" "G" "A" " " " " "A" " " " "C" " " " " "G" " " " "G" " " "C" "G" " " " " " "G" "
SeqID1	241	GTGGGAGACACCTGGGAACCTATAGTCCTAAACCCAACCAATGTAAAAACACGGGGCACGT
SeqID7	241	" " " " "G" " " " " " " " " " "G" " "C" " "TCCG" "G" " " " "C" " " " " " "G" " "G" " "T" " " " " "CA" "G
SeqID1	301	TACTCCTCCTCAAAATATGGATGTAAACTACAGATAGAAAAAACAGCAACAGACATAC
SeqID7	301	" " " " " " " " " "C" " "G" " " " " "C" " "C" " "G" " "C" " " " " "C" " "G" " "G" " "G" " " "G" " " " " "C" " " " "
SeqID1	361	CCCTTTTACGTCTGCCCCGGACATGCCCCCTCGTTGGGGCCAAAGGGAACACATTGTGGA
SeqID7	361	" " " " "C" " "T" " "G" " " " " " "T" " "C" " " " " " " " " " " "C" " " " " "C" " " " "C" " " " " "C" " " " " "C" " " " "G
SeqID1	421	GGGGCACAGATGGGTTTTGTGCGCATGGGGATGTGAGACCACCGGAGAAGCTTGGTGG
SeqID7	421	" " " " "C" " "G" " " " " "C" " "C" " " " " " "T" " "C" " " " " " "C" " " " " "A" " " " "A" " "G" " "G" " "C" " " " " " "
SeqID1	481	AAGCCCACCTCCTCATGGGACTATATCACAGTAAAAAGAGGGAGTAGTCAGGACAATAGC
SeqID7	481	" " " " " " " " " " " " "C" " " " " " " " " "C" " " " " " " " " "G" " "G" " "G" " "CTCCTCC" " " " " " " " " " "CTC" "
SeqID1	541	TGTGAGGGAAAATGCAACCCCCTGGTTTTGCAGTTCACCCAGAAGGGAAGACAAGCCTCT
SeqID7	541	" " " " " " " " " "C" " "G" " " " " " " " " " " " " " "G" "C" " " " " " " " " " " " " " "C" " "G" " "G" " " " " "C
SeqID1	601	TGGGACGGACCTAAGATGTGGGGATTGCGACTATACCGTACAGGATATGACCCTATCGCT
SeqID7	601	" " " " "T" " "C" " "C" " " " " " " " " " " "CC" "A" "G" " "G" " "A" "G" " " " "C" " " " " " " "C" " "T" " "C
SeqID1	661	TTATTACGGTGTCCCGGCAGGTATCAACCATTACGCCGCCTCAGGCAATGGGACCAAAC
SeqID7	661	C" "G" " " " " "A" " " " " "A" " " " " " "G" " "C" " " " " "C" " "C" " "C" " " " " "C" " " " " "C" " " " " "C" " " " "
SeqID1	721	CTAGTCTTACCTGATCAAAAACCCCCATCCCGACAATCTCAAACAGGGTCCAAAGTGGCG
SeqID7	721	" "G" "GC" "G" " " " " "C" " "G" " "G" " " " " "C" " " "A" "G" " "G" " "C" " "G" " " " " "C" " " " " "G" " " " "C
SeqID1	781	ACCCAGAGGCCCAACGAATGAAAAGCGCCCCAAGGTCTGTTGCCCCCACCACCATGGGT
SeqID7	781	" " " " " " " " " " "G" " "C" " " " " " "GTCT" " " " " "C" " " " " " " "G" " " " " " " " " " " " " " "C
SeqID1	841	CCCAAACGGATTGGGACCGGAGATAGGTTAATAAATTTAGTACAAGGGACATACCTAGCC
SeqID7	841	" " " " "GA" " " " " " "C" " "A" " "G" " "C" " " "C" " "G" " "C" " "CC" "G" " "G" " "G" " "C" " "C" " " " " "G" " " "
SeqID1	901	TTAAATGCCACCGACCCCAACAAACTAAAGACTGTTGGCTCTGCCTGGTTTCTCGACCA
SeqID7	901	C" "G" " " " " " " "A" " " " " " " " " " " "G" " "C" " "G" " " " " "C" " " " " "G" " " " " "G" " " " " "G" " " "CA" "G" " "C
SeqID1	961	CCCTATTACGAAGGGATTGCAATCTTAGGTAACCTACAGCAACCAACAAACCCCCCCCCA
SeqID7	961	" " " " "C" " "T" " "G" " "C" " " " " "C" " " "C" " "G" " "C" " " " " " "TC" " " " " " "G" " "C" " " _ " " " " " " " "C
SeqID1	1021	TCCTGCCTATCTACTCCGCAACACAACTAACTATATCTGAAGTATCAGGGCAAGGAAT
SeqID7	1020	C" " " " " " " " "G" " "C" " "C" " "C" " "G" " " " " "G" " "G" " "C" " "C" " " " " "G" " "G" " "T" " "C" " "G" " "C" " "
SeqID1	1080	GTGCATAGGGACTGTTCCATAAAACCCACCAGGCTTTGTGCAATAAGACACAACAGGGACA
SeqID7	1080	" " " " " " "T" " "C" " "A" " "G" " "C" " "G" " " " " " " " " " "CC" " " " " " "C" " " " " "C" " "G" " " " " "C" " "
SeqID1	1140	TACAGGGGCGCACTATCTAGCCGCCCCCAACGGCACCTATTGGGCCTGTAACACTGGACT
SeqID7	1140	C" " " " " " " " "C" " " " " "C" " "G" " "T" "T" " " " " " "T" " " " " " " " " " "C" " " " " " " "C" " " " " "A" " "C" " "

[illegible]

Fig. 7

Protein-Sequenzvergleich: Proteinsequenz des Wildtyps des „gag“-Gens (Seq.ID4) vs. Proteinsequenz des mutagenisierten „gag“-Gens (Seq.ID6).

SeqID4...1	MGQTITTPLSLTLNHWSEVQARARNQGVEVRKKKWITLCEAEWVMNVGWPREGTFITDN
SeqID6...1	""""""""""
SeqID4...61	ISQVEERIFAPGPGYGHDPQIPYITTWRSLATDPPPWVRPFLPPPKHPRTPDPEPLSPQPL
SeqID6...61	""""""""""
SeqID4...121	APQPSSPHPV_LYPVLPKPDPPKAPVLPPNPSSPLIDLLTEEPPPYPGGHGPTPPSGPRT
SeqID6...121	""""A"PISS""""
SeqID4...180	PTASPIAIRLRERRENPAEKSQALPLREDPNNRPPQYWPFSSASDLYNWKLNPPFSQDPVA
SeqID6...181	""""S""""
SeqID4...240	LTNLIESILVTHQPTWDDCQQLLQALLTAEERQRVLLLEARKQVPGEDGRPTQLPNVVDEA
SeqID6...241	""""""""""
SeqID4...300	FPLTRPNWDFCTPAGREHLRLYRQLLLAGLRGAARRPTNLAQVKQVVQGKEETPASFLER
SeqID6...301	""""""""""
SeqID4...360	LKEAYRMYTPYDPEDPGQAASVILSFIYQSSPDIRNKLQRLEGLQGFTLSDLLKEAEKIY
SeqID6...361	""""T""""
SeqID4...420	NKRETPEEREERLWQRQEERDKKRHKEMTKVLATVVAQNDRDKDRGESKLGDKRKIPLGKD
SeqID6...421	""""""""""
SeqID4...480	QCAYCKEKGHWVRDCPKRPRKKPANSTLL
SeqID6...481	""""""""""

Fig. 8

Protein-Sequenzvergleich: Wildtyp des „env“-Protein (Seq.ID3) vs.
Proteinsequenz des mutagenisierten „env“-Proteins (gp70) (Seq.ID10)

SeqID3	1	MESPTHPKPSKDKTLSWNLAFVLVGILFTIDIGMANPSPHQIYNVTWVITNVQTNQTQANAT
SeqID10	1	""""""""""""""""""""MV""""""""""""""""""""PR""""""""""""""""""""
SeqID3	61	SMLGTLTDAYPTLHVDLCLVGDWTWEPIVLNPTNVKHGARYSSSKYGCKTTDRKKQQQTY
SeqID10	61	""""""""""""""""""""p""""""""""""""""""""
SeqID3	121	PFYVCPGHAPSLGPKGTHCGGAQDGFCAAWGCETTGEAWWKPTSSWDYITVKRGSSQDNS
SeqID10	121	""""""""""""""""""""
SeqID3	181	CEGKCNPLVLQFTQKGRQASWDGPKMWGLRLYRTGYDPIALFTVSRQVSTITPPQAMGPN
SeqID10	181	""""""""""""""""""""
SeqID3	241	LVLDPQKPPSRQSQTGSKVATQRPQTNESAPRSVAPTTMGPKRIGTGDRLINLVQGTyla
SeqID10	241	""""""""""""""""""""
SeqID3	301	LNATDPNKTkDCWLCLVSRPPYYEGIAILGNYSNQTNPPPSCLSTPQHKLITISEVSGQGM
SeqID10	301	""""""""""""""""""""
SeqID3	361	CIGTVPKTHQALCNKTQQGHTGAHYLAAPNGTYWACNTGLTPCISMAVLNWTSDFCVLIE
SeqID10	361	""""""""""""""""""""v""""""""""""""""""""
SeqID3	421	LWPRVTYHQPEYVYTHFAKAVRFRREPISLTVALMLGGLTVGGIAAGVGTGKALLETA
SeqID10	421	""""""""""""""""""""

Fig. 9

Protein-Sequenzvergleich: Wildtyp des „env“-Protein (Seq.ID3) vs.
Proteinsequenz des mutagenisierten „env“-Proteins (gp85) (Seq.ID9)

SeqID3	1	MESPTHPKPSKDKTLSWNLAFVLVGILFTIDIGMANPSPHQIYNVTWVITNVQTNTQANAT
SeqID9	1	""""""""""""""""""""MY""""""""""PR""""""""""
SeqID3	61	SMLGTLTDAYPTLHVLDLCLVGDWEPVLNPTNVKHGARYSSSKYGCKTTDRKKQQQTY
SeqID9	61	""""""""""""""""""""p""""""""""
SeqID3	121	PFYVCPGHAPSLGPKGTHCGGAQDGFCAAWGCETTGEAWWKPTSSWDYITVKGSSQDNS
SeqID9	121	""""""""""""""""""""
SeqID3	181	CEGKCNPLVLQFTQKGRQASWDGPKMWGLRLYRTGYDPIALFTVSRQVSTITPPQAMGPN
SeqID9	181	""""""""""""""""""""
SeqID3	241	LVLDPQKPPSRQSQTGSKVATQRPQTNESAPRSVAPTTMGPKRIGTGDRLINLVQGYLA
SeqID9	241	""""""""""""""""""""
SeqID3	301	LNATDPNKTDCWLCLVSRPPYYEGIAILGNYSNQTNPSPCLSTPQHKLITISEVSGQGM
SeqID9	301	""""""""""""""""""""
SeqID3	361	CIGTVPKTHQALCNKTQQGHTGAHYLAAPNGTYWACNTGLTPCISMAVLNWTSDFCVLIE
SeqID9	361	""""""""""""""""""""v""""""""""
SeqID3	421	LWPRVTYHQPEYVYTHFAKAVRFRREPISLTVALMLGGLTVGGIAAGVGTGTKALLETAQ
SeqID9	421	""""""""""""""""""""
SeqID3	481	FRQLQMAMHTDIQALEESISALEKSLTSLSEVVLQNRRLDILFLQEGGLCAALKEECCF
SeqID9	481	""""""""""""""""""""v""""""""""
SeqID3	541	YADHTGLVRDNMAKLRLRERLKQRQQLFDSQQGWFEWGNKSPWFTTLISSIMGPLLILLI
SeqID9	541	""""""""""""""""""""L""""""""""
SeqID3	601	LLFGPCILNRLVQFVKDRISVVQALILTQQYQQIKQYDPDRP
SeqID9	601	""""""""""""""""""""v""""""""""

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> Impfstoff gegen Infektionen mit Onkoviren, wie dem feline Leukosevirus der Katze

<130> XI 1292-03

<150> DE 102 44 863.9

<151> 2002-09-23

<160> 40

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1929

<212> DNA

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1929)

<223> DNA sequence wild type "env" gene without signal peptide coding region

<300>

<308> NCBI M12500

<309> 2001-02-21

<313> (162)..(1990)

<400> 1
atggaaagtc caacgcaccc aaaaccctct aaagataaga ctctctcgtg gaacttagcg 60
tttctgggtg ggatcttatt tacaatagac ataggaatgg ccaatcctag tccacaccaa 120
atatataatg taacttgggt aataaccaat gtacaaacta acaccaagc taacgccacc 180

Mo1ogen FeLV-PCT.ST25.txt

tctatgtag gaaccttaac cgatgcctac cctaccctac atgttgactt atgtgaccta 240
gtgggagaca cctgggaacc tatagtccta aacccaacca atgtaaaaca cggggcacgt 300
tactcctcct caaatatgg atgtaaaact acagatagaa aaaaacagca acagacatac 360
cccttttacg tctgccccgg acatgcccc tcgttggggc caaagggaac acattgtgga 420
ggggcacaag atgggttttg tgccgcatgg ggatgtgaga ccaccggaga agcttggtgg 480
aagcccacct cctcatggga ctatatcaca gtaaaaagag ggagtagtca ggacaatagc 540
tgtgaggga aatgcaaccc cctggttttg cagttcaccc agaagggaag acaagcctct 600
tgggacggac ctaagatgtg gggattgca ctataccgta caggatatga ccctatcgct 660
ttattcacgg tgtcccgga ggtatcaacc attacgccg ctcaggcaat gggaccaaac 720
ctagtcttac ctgatcaaaa acccccatcc cgacaatctc aaacagggtc caaagtggcg 780
accagaggc cccaaacgaa tgaaagcgcc ccaaggctctg ttgccccac caccatgggt 840
cccaaacgga ttgggaccgg agatagggtta ataaatttag tacaagggaac atacctagcc 900
ttaaatgcca cggacccaa caaaactaaa gactgttggc tctgcctggt ttctcgacca 960
ccctattacg aagggttgc aatcttaggt aactacagca accaaacaaa cccccccca 1020
tcctgcctat ctactccgca acacaaacta actatatctg aagtatcagg gcaaggaatg 1080
tgcataggga ctgttcctaa aaccaccag gctttgtgca ataagacaca acagggacat 1140
acaggggagc actatctagc cgcccccaac ggcacctatt gggcctgtaa cactggactc 1200
accccatgca tttccatggc ggtgctcaat tggacctctg atttttgtgt cttaatcgaa 1260
ttatggccca gagtgactta ccatcaaccc gaatatgtgt acacacattt tgccaaagct 1320
gtcagggttc gaagagaacc aatatcacta acggttgccc ttatgttggg aggacttact 1380
gtagggggca tagccgcggg ggtcggaaca gggactaaag ccctccttga aacagcccag 1440
ttcagacaac tacaaatggc catgcacaca gacatccagg ccctagaaga atcaattagt 1500
gccttagaaa agtccttgac ctccctttct gaagtagtct tacaaaacag acggggccta 1560
gatattctat tcttacaaga gggagggtc tgtgccgcat tgaaagaaga atgttgcttc 1620
tatgcggatc acaccggact cgtccgagac aatatggcca aattaagaga aagactaaaa 1680
cagcggcaac aactgtttga ctcccaacag ggatggtttg aaggatgggt caacaagtcc 1740
ccctggttta caaccctaatt ttctccatt atggggccct tactaatcct actcctaatt 1800
ctcctcttcg gcccatgcat ccttaaccga ttagtacaat tcgtaaaaga cagaatatct 1860
gtggtacagg cttaattttt aacccaacag taccaacaga taaagcaata cgatccggac 1920
cgaccatga 1929

<210> 2

<211> 1527

<212> DNA

Molgen FeLV-PCT.ST25.txt

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1527)

<223> DNA sequence wild type "gag" gene

```
<400> 2
atgggccaaa ctataactac ccccttgagc ctcaccctca accactgggc tgagggttcag    60
gcacggggccc gtaatcaggg tgtcgaagtc cggaaaaaga aatggattac actgtgtgaa   120
gccgaatggg taatgatgaa ttagagttgg ccccgagaag gaactttcac cattgacaat   180
atttcacagg tcgaggagag aatcttcgcc ccggggccat atggacaccc agatcaaadc   240
ccttatatta ccacgtggag atccctagcc acagaccccc ctccatgggt tcgcccattc   300
ctacccccctc ctaagcatcc caggacagat cctcccgagc ctctttcgcc gcaacctctt   360
gcgccgcaac cctcttcccc ccaccccgtc ctctaccccg ttctcccca accagacccc   420
cccaaggcgc ctgtattacc acccaatcct tcttcccctt taattgatct cttaacagaa   480
gagccacctc cctatcctgg gggtcacggg ccaacaccgc cgtcaggccc tagaacccca   540
actgcctccc cgattgccat ccggctgcga gaacgacgag aaaatccagc tgagaaatct   600
caagccctcc ccttaaggga agacccaaac aacagacccc agtactggcc attctcggcc   660
tctgacctgt acaattggaa attgcataac ccccttttct ccaggacccc agtggcccta   720
actaacctaa ttgagtccat tttagtgaac catcagccaa cctgggacga ctgccaacag   780
ctcttacagg ctctcctgac ggcagaggag agacaaaggg tcctccttga agcccgaag   840
caagttccag gcgaggacgg acggccaacc cagctgccc aatgtcgttga cgaggctttc   900
cccttgaccc gtcccaactg ggatttttgt acgcccgcag gtagggagca cctacgcctt   960
tatcgccagt tgctgttagc ggggctccgc ggggctgcaa gacgccccac taatttgga  1020
caggtaaagc aagttgtaca agggaaagag gaaacgccag cctcattctt agaaagatta  1080
aaagaggctt acagaatgta tactccctat gaccctgagg acccagggca ggctgctagt  1140
gttatcctgt cttttatcta ccagtctagc ccggacataa gaaataagtt acaaaggcta  1200
gaaggcctac aggggttcac actgtctgat ttgctaaaag aggcagaaaa gatatacaac  1260
aaaagggaaa cccagagga aagggaagaa agattatggc agcggcagga agaaagagat  1320
aaaaagcgcc ataaggagat gactaaagtt ctggccacag tagttgctca gaatagagat  1380
aaggatagag gggaaagtaa actgggagat caaaggaaaa tacctctggg gaaagaccag  1440
tgtgcctatt gcaaggaaaa gggacattgg gttcgcgatt gcccgaacg accccggaag  1500
aaacccgcca actccactct cctctaa                                1527
```


Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<210> 3

<211> 642

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(447)

<223> Amino acid sequence of the protein corresponding to Seq.ID1

<400> 3

Met Glu Ser Pro Thr His Pro Lys Pro Ser Lys Asp Lys Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Trp Asn Leu Ala Phe Leu Val Gly Ile Leu Phe Thr Ile Asp Ile Gly
 20 25 30

Met Ala Asn Pro Ser Pro His Gln Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile
 35 40 45

Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala Asn Ala Thr Ser Met Leu Gly
 50 55 60

Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu Cys Asp Leu
 65 70 75 80

Val Gly Asp Thr Trp Glu Pro Ile Val Leu Asn Pro Thr Asn Val Lys
 85 90 95

His Gly Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Lys Tyr Gly Cys Lys Thr Thr Asp
 100 105 110

Arg Lys Lys Gln Gln Gln Thr Tyr Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His
 115 120 125

Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr His Cys Gly Gly Ala Gln Asp
 130 135 140

Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu Ala Trp Trp
 145 150 155 160

Lys Pro Thr Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser
 165 170 175

Gln Asp Asn Ser Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Val Leu Gln Phe
 180 185 190

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Thr Gln Lys Gly Arg Gln Ala Ser Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly
 195 200 205
 Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp Pro Ile Ala Leu Phe Thr Val
 210 215 220
 Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met Gly Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly
 245 250 255
 Ser Lys Val Ala Thr Gln Arg Pro Gln Thr Asn Glu Ser Ala Pro Arg
 260 265 270
 Ser Val Ala Pro Thr Thr Met Gly Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp
 275 280 285
 Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr Tyr Leu Ala Leu Asn Ala Thr
 290 295 300
 Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val Ser Arg Pro
 305 310 315 320
 Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr
 325 330 335
 Asn Pro Pro Pro Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile
 340 345 350
 Ser Glu Val Ser Gly Gln Gly Met Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr
 355 360 365
 His Gln Ala Leu Cys Asn Lys Thr Gln Gln Gly His Thr Gly Ala His
 370 375 380
 Tyr Leu Ala Ala Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn Thr Gly Leu
 385 390 395 400
 Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys
 405 410 415
 Val Leu Ile Glu Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr
 420 425 430
 Val Tyr Thr His Phe Ala Lys Ala Val Arg Phe Arg Arg Glu Pro Ile
 435 440 445
 Ser Leu Thr Val Ala Leu Met Leu Gly Gly Leu Thr Val Gly Gly Ile
 450 455 460

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Leu Glu Thr Ala Gln
465 475 480

Phe Arg Gln Leu Gln Met Ala Met His Thr Asp Ile Gln Ala Leu Glu
485 490 495

Glu Ser Ile Ser Ala Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val
500 505 510

Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln Glu Gly
515 520 525

Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His
530 535 540

Thr Gly Leu Val Arg Asp Asn Met Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Lys
545 550 555 560

Gln Arg Gln Gln Leu Phe Asp Ser Gln Gln Gly Trp Phe Glu Gly Trp
565 570 575

Phe Asn Lys Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Ile Ser Ser Ile Met Gly
580 585 590

Pro Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu
595 600 605

Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala
610 615 620

Leu Ile Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Gln Ile Lys Gln Tyr Asp Pro Asp
625 630 635 640

Arg Pro

<210> 4

<211> 508

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(508)

<223> Amino acid sequence of the protein corresponding to Seq.ID2

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<400> 4

Met Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Asn His Trp
 1 5 10 15
 Ser Glu Val Gln Ala Arg Ala Arg Asn Gln Gly Val Glu Val Arg Lys
 20 25 30
 Lys Lys Trp Ile Thr Leu Cys Glu Ala Glu Trp Val Met Met Asn Val
 35 40 45
 Gly Trp Pro Arg Glu Gly Thr Phe Thr Ile Asp Asn Ile Ser Gln Val
 50 55 60
 Glu Glu Arg Ile Phe Ala Pro Gly Pro Tyr Gly His Pro Asp Gln Ile
 65 70 75 80
 Pro Tyr Ile Thr Thr Trp Arg Ser Leu Ala Thr Asp Pro Pro Pro Trp
 85 90 95
 Val Arg Pro Phe Leu Pro Pro Pro Lys His Pro Arg Thr Asp Pro Pro
 100 105 110
 Glu Pro Leu Ser Pro Gln Pro Leu Ala Pro Gln Pro Ser Ser Pro His
 115 120 125
 Pro Val Leu Tyr Pro Val Leu Pro Lys Pro Asp Pro Pro Lys Ala Pro
 130 135 140
 Val Leu Pro Pro Asn Pro Ser Ser Pro Leu Ile Asp Leu Leu Thr Glu
 145 150 155 160
 Glu Pro Pro Pro Tyr Pro Gly Gly His Gly Pro Thr Pro Pro Ser Gly
 165 170 175
 Pro Arg Thr Pro Thr Ala Ser Pro Ile Ala Ile Arg Leu Arg Glu Arg
 180 185 190
 Arg Glu Asn Pro Ala Glu Lys Ser Gln Ala Leu Pro Leu Arg Glu Asp
 195 200 205
 Pro Asn Asn Arg Pro Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ala Ser Asp Leu Tyr
 210 215 220
 Asn Trp Lys Leu His Asn Pro Pro Phe Ser Gln Asp Pro Val Ala Leu
 225 230 235 240
 Thr Asn Leu Ile Glu Ser Ile Leu Val Thr His Gln Pro Thr Trp Asp
 245 250 255

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Asp Cys Gln Gln Leu Leu Gln Ala Leu Leu Thr Ala Glu Glu Arg Gln
 260 265 270

Arg Val Leu Leu Glu Ala Arg Lys Gln Val Pro Gly Glu Asp Gly Arg
 275 280 285

Pro Thr Gln Leu Pro Asn Val Val Asp Glu Ala Phe Pro Leu Thr Arg
 290 295 300

Pro Asn Trp Asp Phe Cys Thr Pro Ala Gly Arg Glu His Leu Arg Leu
 305 310 315 320

Tyr Arg Gln Leu Leu Leu Ala Gly Leu Arg Gly Ala Ala Arg Arg Pro
 325 330 335

Thr Asn Leu Ala Gln Val Lys Gln Val Val Gln Gly Lys Glu Glu Thr
 340 345 350

Pro Ala Ser Phe Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Met Tyr Thr
 355 360 365

Pro Tyr Asp Pro Glu Asp Pro Gly Gln Ala Ala Ser Val Ile Leu Ser
 370 375 380

Phe Ile Tyr Gln Ser Ser Pro Asp Ile Arg Asn Lys Leu Gln Arg Leu
 385 390 395 400

Glu Gly Leu Gln Gly Phe Thr Leu Ser Asp Leu Leu Lys Glu Ala Glu
 405 410 415

Lys Ile Tyr Asn Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Leu
 420 425 430

Trp Gln Arg Gln Glu Glu Arg Asp Lys Lys Arg His Lys Glu Met Thr
 435 440 445

Lys Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Arg Asp Lys Asp Arg Gly
 450 455 460

Glu Ser Lys Leu Gly Asp Gln Arg Lys Ile Pro Leu Gly Lys Asp Gln
 465 470 475 480

Cys Ala Tyr Cys Lys Glu Lys Gly His Trp Val Arg Asp Cys Pro Lys
 485 490 495

Arg Pro Arg Lys Lys Pro Ala Asn Ser Thr Leu Leu
 500 505

<210> 5

<211> 1530

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<212> DNA

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1530)

<223> DNA sequence of the mutagenized "gag" gene

<400> 5
atgggccaga ccatcaccac cccctgagc ctgaccctga accactggag cgaggtgcag 60
gccagggcca ggaaccagg cgtggaggtg aggaagaaga agtggatcac cctgtgcgag 120
gccgagtggg tgatgatgaa cgtgggctgg cccagggagg gcaccttcac catcgacaac 180
atcagccagg tggaggagag gatcttcgcc cccggccccct acggccaccc cgaccagatc 240
ccctacatca ccacctggag gagcctggcc accgaccccc cccctgggtg gaggcccttc 300
ctgccccccc ccaagcacc caggaccgac ccccccagc ccctgagccc ccagcccctg 360
gccccccagc ccagcgcccc ccccatcagc agcctgtacc ccgtgctgcc caagcccagc 420
ccccccaagg cccccgtgct gcccccaac cccagcagcc ccctgatcga cctgctgacc 480
gaggagcccc cccctaccc cggcggccac ggccccaccc ccccagcgg cccaggacc 540
cccaccgcca gccccatgc cagcaggctg agggagagga gggagaaccc cgccgagaag 600
agccaggccc tgccctgag ggaggacccc aacaacaggc cccagtactg gcccttcagc 660
gccagcgacc tgtacaactg gaagctgcac accccccct tcagccagga cccgtggcc 720
ctgaccaacc tgatcgagag catcctggtg acccaccagc ccacctggga cgactgccag 780
cagctgctgc aggccctgct gaccgcccag gagaggcaga gggtgctgct ggaggccagg 840
aagcaggtgc ccggcgagga cggcaggccc acccagctgc ccaacgtggt ggacgaggcc 900
ttccccctga ccaggcccaa ctgggacttc tgcacccccg ccggcagggg gcacctgagg 960
ctgtacaggc agctgctgct ggccggcctg aggggcgccc ccaggaggcc caccaacctg 1020
gcccaggtga agcaggtggt gcagggcaag gaggagacac ccgccagctt cctggagagg 1080
ctgaaggagg cctacaggat gtacaccccc tacgaccccg aggaccccgg ccaggccacc 1140
agcgtgatcc tgagcttcat ctaccagagc agccccgaca tcaggaacaa gctgcagagg 1200
ctggagggcc tgcagggtt caccctgagc gacctgctga aggaggccga gaagatctac 1260
aacaagaggg agacaccga ggagagggag gagaggctgt ggagaggca ggaggagagg 1320
gacaagaaga ggcacaagga gatgaccaag gtgctggcca ccgtggtggc ccagaacagg 1380
gacaaggaca ggggcgagag caagctgggc gaccagagga agatccccct gggcaaggac 1440
cagtgcgcct actgcaagga gaaggccac tgggtgaggg actgccccaa gaggcccagg 1500
aagaagccc ccaacagcac cctgctgtag 1530

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<210> 6

<211> 509

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(509)

<223> Amino acid sequence of the protein corresponding to Seq.ID5

<400> 6

Met Gly Gln Thr Ile Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Asn His Trp
1 5 10 15Ser Glu Val Gln Ala Arg Ala Arg Asn Gln Gly Val Glu Val Arg Lys
20 25 30Lys Lys Trp Ile Thr Leu Cys Glu Ala Glu Trp Val Met Met Asn Val
35 40 45Gly Trp Pro Arg Glu Gly Thr Phe Thr Ile Asp Asn Ile Ser Gln Val
50 55 60Glu Glu Arg Ile Phe Ala Pro Gly Pro Tyr Gly His Pro Asp Gln Ile
65 70 75 80Pro Tyr Ile Thr Thr Trp Arg Ser Leu Ala Thr Asp Pro Pro Pro Trp
85 90 95Val Arg Pro Phe Leu Pro Pro Pro Lys His Pro Arg Thr Asp Pro Pro
100 105 110Glu Pro Leu Ser Pro Gln Pro Leu Ala Pro Gln Pro Ser Ala Pro Pro
115 120 125Ile Ser Ser Leu Tyr Pro Val Leu Pro Lys Pro Asp Pro Pro Lys Ala
130 135 140Pro Val Leu Pro Pro Asn Pro Ser Ser Pro Leu Ile Asp Leu Leu Thr
145 150 155 160Glu Glu Pro Pro Pro Tyr Pro Gly Gly His Gly Pro Thr Pro Pro Ser
165 170 175

11/30

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Gly Pro Arg Thr Pro Thr Ala Ser Pro Ile Ala Ser Arg Leu Arg Glu
 180 185 190

Arg Arg Glu Asn Pro Ala Glu Lys Ser Gln Ala Leu Pro Leu Arg Glu
 195 200 205

Asp Pro Asn Asn Arg Pro Gln Tyr Trp Pro Phe Ser Ala Ser Asp Leu
 210 215 220

Tyr Asn Trp Lys Leu His Asn Pro Pro Phe Ser Gln Asp Pro Val Ala
 225 230 235 240

Leu Thr Asn Leu Ile Glu Ser Ile Leu Val Thr His Gln Pro Thr Trp
 245 250 255

Asp Asp Cys Gln Gln Leu Leu Gln Ala Leu Leu Thr Ala Glu Glu Arg
 260 265 270

Gln Arg Val Leu Leu Glu Ala Arg Lys Gln Val Pro Gly Glu Asp Gly
 275 280 285

Arg Pro Thr Gln Leu Pro Asn Val Val Asp Glu Ala Phe Pro Leu Thr
 290 295 300

Arg Pro Asn Trp Asp Phe Cys Thr Pro Ala Gly Arg Glu His Leu Arg
 305 310 315 320

Leu Tyr Arg Gln Leu Leu Leu Ala Gly Leu Arg Gly Ala Ala Arg Arg
 325 330 335

Pro Thr Asn Leu Ala Gln Val Lys Gln Val Val Gln Gly Lys Glu Glu
 340 345 350

Thr Pro Ala Ser Phe Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Met Tyr
 355 360 365

Thr Pro Tyr Asp Pro Glu Asp Pro Gly Gln Ala Thr Ser Val Ile Leu
 370 375 380

Ser Phe Ile Tyr Gln Ser Ser Pro Asp Ile Arg Asn Lys Leu Gln Arg
 385 390 395 400

Leu Glu Gly Leu Gln Gly Phe Thr Leu Ser Asp Leu Leu Lys Glu Ala
 405 410 415

Glu Lys Ile Tyr Asn Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg
 420 425 430

Leu Trp Gln Arg Gln Glu Glu Arg Asp Lys Lys Arg His Lys Glu Met
 435 440 445

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Thr Lys Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Arg Asp Lys Asp Arg
 450 455 460

Gly Glu Ser Lys Leu Gly Asp Gln Arg Lys Ile Pro Leu Gly Lys Asp
 465 470 475 480

Gln Cys Ala Tyr Cys Lys Glu Lys Gly His Trp Val Arg Asp Cys Pro
 485 490 495

Lys Arg Pro Arg Lys Lys Pro Ala Asn Ser Thr Leu Leu
 500 505

<210> 7

<211> 1929

<212> DNA

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1929)

<223> DNA sequence for the mutagenized "env" gene (gp85)

<400> 7
 atggagtccc ccaccaccc caagccctcc aaggacaaga ccctgtcctg gaacatggtg 60
 ttcctggtgg gcatcctgtt caccattgac attggcatgg ccaaccctc cccccccgg 120
 atctacaatg tgacctgggt gatcaccaat gtgcagacca acaccaggc caatgccacc 180
 tctatgctgg gcaccctgac agatgcatac cccaccctgc atgtggacct gtgtgacctg 240
 gtgggggaca cctgggagcc cattccgctg aacccaccca atgtgaagca tggggccagg 300
 tactctctct ccaagtatgg ctgcaagacc acagacagga agaagcagca gcagacctac 360
 cccttctatg tgtgccctgg ccatgcccc tccctgggcc ccaagggcac cactgtggg 420
 ggggccagg atggcttctg tgctgcctgg ggctgtgaaa ccacagggga ggcctggtgg 480
 aagcccacct cctcctggga ctacatcaca gtgaagaggg gctcctcca ggacaactcc 540
 tgtgagggca agtgcaaccc cctggtgctg cagttcacc agaagggcag gcaggcctcc 600
 tgggatggcc ccaagatgtg gggcctgagg ctgtacagga caggctatga cccattgcc 660
 ctgttcacag tgtccaggca ggtgtccacc atcaccccc cccaggccat gggccccaac 720
 ctggtgctgc ctgaccagaa gccccctcc aggcagtccc agacaggctc caaggtggcc 780
 acccagaggc cccagaccaa tgagtctgcc cccaggctct tggccccac cccattggg 840
 cccaagagga ttggcacagg ggacaggctg atcaacctgg tgcagggcac ctacctggcc 900
 ctgaatgcca cagaccccaa caagaccaag gactgctggc tgtgcctggt gtccaggccc 960

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

```

ccctactatg agggcattgc catcctgggc aactactcca accagaccaa cccccccccc 1020
tcctgcctgt ccacccccca gcacaagctg accatctctg aggtgtctgg ccagggcatg 1080
tgcatgggca cagtgcccaa gaccaccag gccctgtgca acaagacca gcagggccac 1140
acagggggccc actacctggc tgtccccaat ggcacctact gggcctgcaa cacaggcctg 1200
accccctgca tctccatggc tgtgctgaac tggacctctg acttctgtgt gctgattgag 1260
ctgtggccca gggtgacctt ccaccagcct gagtatgtgt acaccactt tgccaaggct 1320
gtgaggttca ggaggagacc catctccctg acagtggccc tgatgctggg gggcctgaca 1380
gtgggggggca ttgctgctgg ggtgggcaca ggcaccaagg ccctgctgga aacagcccag 1440
ttcagacaac taaaaatggc catgcacaca gacatccagg ccctagaaga gtcagttagc 1500
gcttttagaaa aatccctgac ctccctctct gaagtagtcc taaaaacag acgaggccta 1560
gatattctat tcctacaaga gggaggactc tgtgccgcat taaaagaaga atgttgtttt 1620
tatgcagatc acaccggatt agtccgagat aatatggcta aattaagaga aagattaaaa 1680
cagcggcaac aactgtttga ctccaacag ggatggtttg aaggatgggt caacaagtcc 1740
ccctggctta caaccctaatt ttctctatt atgggccctt tgcttaccct gctcctaatt 1800
ctcctcttcg gcccatgcat ccttaaccga ttggtgcaat tcgtaaaaga cagaatatcg 1860
gtggtacaag ccttagtttt aaccaacag taccaacaga taaagcaata cgatccggac 1920
cgaccatga 1929

```

<210> 8

<211> 1440

<212> DNA

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1440)

<223> DNA Sequence of the mutagenized "env" gene (gp70)

```

<400> 8
atggagtccc ccaccaccc caagccctcc aaggacaaga ccctgtcctg gaacatgggtg 60
ttctgggtgg gcatcctgtt caccattgac attggcatgg ccaaccctc ccccccccg 120
atctacaatg tgacctgggt gatcaccaat gtgcagacca acaccaggc caatgccacc 180
tctatgctgg gcaccctgac agatgcatac cccaccctgc atgtggacct gtgtgacctg 240
gtggggggaca cctgggagcc cattccgctg aaccacacca atgtgaagca tggggccagg 300
tactcctcct ccaagtatgg ctgcaagacc acagacagga agaagcagca gcagacctac 360

```

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

```

cccttctatg tgtgccctgg ccatgcccc tccctgggcc ccaagggcac ccactgtggg 420
ggggcccagg atggcttctg tgctgcctgg ggctgtgaaa ccacagggga ggcctggtgg 480
aagcccacct cctcctggga ctacatcaca gtgaagaggg gctcctccca ggacaactcc 540
tgtgagggca agtgcaaccc cctggtgctg cagttcaccc agaagggcag gcaggcctcc 600
tgggatggcc ccaagatgtg gggcctgagg ctgtacagga caggctatga cccattggcc 660
ctgttcacag tgtccaggca ggtgtccacc atcaccccc cccaggccat gggccccaac 720
ctggtgctgc ctgaccagaa gccccctcc aggcagtccc agacaggctc caaggtggcc 780
acccagaggg cccagaccaa tgagtctgcc cccagggtctg tggccccac caccatgggc 840
cccaagagga ttggcacagg ggacaggctg atcaacctgg tgcagggcac ctacctggcc 900
ctgaatgcc aagaccccaa caagaccaag gactgctggc tgtgcctggt gtccaggccc 960
ccctactatg agggcattgc catcctgggc aactactcca accagaccaa ccccccccc 1020
tcctgcctgt ccacccccca gcacaagctg accatctctg aggtgtctgg ccagggcattg 1080
tgcattggca cagtgcccaa gaccaccag gccctgtgca acaagacca gcagggccac 1140
acagggggcc actacctggc tgtcccaat ggcacctact gggcctgcaa cacaggcctg 1200
accccctgca tctccatggc tgtgctgaac tggacctctg acttctgtgt gctgattgag 1260
ctgtggccca gggtgacctt ccaccagcct gagtatgtgt acaccactt tgccaaggct 1320
gtgaggttca ggaggagcc catctccctg acagtggccc tgatgctggg gggcctgaca 1380
gtggggggca ttgctgctgg ggtgggcaca ggcaccaagg ccctgctgga aacagcctga 1440

```

<210> 9

<211> 642

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(642)

<223> Amino acid sequence of the protein corresponding to Seq.ID7

<400> 9

```

Met Glu Ser Pro Thr His Pro Lys Pro Ser Lys Asp Lys Thr Leu Ser
1           5           10          15

```

```

Trp Asn Met Val Phe Leu Val Gly Ile Leu Phe Thr Ile Asp Ile Gly
20          25          30

```

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Met Ala Asn Pro Ser Pro Pro Arg Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile
 35 40 45
 Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala Asn Ala Thr Ser Met Leu Gly
 50 55 60
 Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu Cys Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Gly Asp Thr Trp Glu Pro Ile Pro Leu Asn Pro Thr Asn Val Lys
 85 90 95
 His Gly Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Lys Tyr Gly Cys Lys Thr Thr Asp
 100 105 110
 Arg Lys Lys Gln Gln Gln Thr Tyr Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His
 115 120 125
 Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr His Cys Gly Gly Ala Gln Asp
 130 135 140
 Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu Ala Trp Trp
 145 150 155 160
 Lys Pro Thr Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser
 165 170 175
 Gln Asp Asn Ser Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Val Leu Gln Phe
 180 185 190
 Thr Gln Lys Gly Arg Gln Ala Ser Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly
 195 200 205
 Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp Pro Ile Ala Leu Phe Thr Val
 210 215 220
 Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met Gly Pro Asn
 225 230 235 240
 Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly
 245 250 255
 Ser Lys Val Ala Thr Gln Arg Pro Gln Thr Asn Glu Ser Ala Pro Arg
 260 265 270
 Ser Val Ala Pro Thr Thr Met Gly Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp
 275 280 285
 Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr Tyr Leu Ala Leu Asn Ala Thr
 290 295 300

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val Ser Arg Pro
 305 310 315 320
 Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr
 325 330 335
 Asn Pro Pro Pro Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile
 340 345 350
 Ser Glu Val Ser Gly Gln Gly Met Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr
 355 360 365
 His Gln Ala Leu Cys Asn Lys Thr Gln Gln Gly His Thr Gly Ala His
 370 375 380
 Tyr Leu Ala Val Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn Thr Gly Leu
 385 390 395 400
 Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys
 405 410 415
 Val Leu Ile Glu Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr
 420 425 430
 Val Tyr Thr His Phe Ala Lys Ala Val Arg Phe Arg Arg Glu Pro Ile
 435 440 445
 Ser Leu Thr Val Ala Leu Met Leu Gly Gly Leu Thr Val Gly Gly Ile
 450 455 460
 Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Leu Glu Thr Ala Gln
 465 470 475 480
 Phe Arg Gln Leu Gln Met Ala Met His Thr Asp Ile Gln Ala Leu Glu
 485 490 495
 Glu Ser Val Ser Ala Leu Glu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val
 500 505 510
 Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Ile Leu Phe Leu Gln Glu Gly
 515 520 525
 Gly Leu Cys Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ala Asp His
 530 535 540
 Thr Gly Leu Val Arg Asp Asn Met Ala Lys Leu Arg Glu Arg Leu Lys
 545 550 555 560
 Gln Arg Gln Gln Leu Phe Asp Ser Gln Gln Gly Trp Phe Glu Gly Trp
 565 570 575

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Phe Asn Lys Ser Pro Trp Leu Thr Thr Leu Ile Ser Ser Ile Met Gly
 580 585 590

Pro Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Leu Phe Gly Pro Cys Ile Leu
 595 600 605

Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala
 610 615 620

Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Gln Ile Lys Gln Tyr Asp Pro Asp
 625 630 635 640

Arg Pro

<210> 10

<211> 479

<212> PRT

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(479)

<223> Amino acid sequence of the protein corresponding to Seq.ID8

<400> 10

Met Glu Ser Pro Thr His Pro Lys Pro Ser Lys Asp Lys Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Trp Asn Met Val Phe Leu Val Gly Ile Leu Phe Thr Ile Asp Ile Gly
 20 25 30

Met Ala Asn Pro Ser Pro Pro Arg Ile Tyr Asn Val Thr Trp Val Ile
 35 40 45

Thr Asn Val Gln Thr Asn Thr Gln Ala Asn Ala Thr Ser Met Leu Gly
 50 55 60

Thr Leu Thr Asp Ala Tyr Pro Thr Leu His Val Asp Leu Cys Asp Leu
 65 70 75 80

Val Gly Asp Thr Trp Glu Pro Ile Pro Leu Asn Pro Thr Asn Val Lys
 85 90 95

His Gly Ala Arg Tyr Ser Ser Ser Lys Tyr Gly Cys Lys Thr Thr Asp
 100 105 110

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Arg Lys Lys Gln Gln Gln Thr Tyr Pro Phe Tyr Val Cys Pro Gly His
 115 120 125

Ala Pro Ser Leu Gly Pro Lys Gly Thr His Cys Gly Gly Ala Gln Asp
 130 135 140

Gly Phe Cys Ala Ala Trp Gly Cys Glu Thr Thr Gly Glu Ala Trp Trp
 145 150 155 160

Lys Pro Thr Ser Ser Trp Asp Tyr Ile Thr Val Lys Arg Gly Ser Ser
 165 170 175

Gln Asp Asn Ser Cys Glu Gly Lys Cys Asn Pro Leu Val Leu Gln Phe
 180 185 190

Thr Gln Lys Gly Arg Gln Ala Ser Trp Asp Gly Pro Lys Met Trp Gly
 195 200 205

Leu Arg Leu Tyr Arg Thr Gly Tyr Asp Pro Ile Ala Leu Phe Thr Val
 210 215 220

Ser Arg Gln Val Ser Thr Ile Thr Pro Pro Gln Ala Met Gly Pro Asn
 225 230 235 240

Leu Val Leu Pro Asp Gln Lys Pro Pro Ser Arg Gln Ser Gln Thr Gly
 245 250 255

Ser Lys Val Ala Thr Gln Arg Pro Gln Thr Asn Glu Ser Ala Pro Arg
 260 265 270

Ser Val Ala Pro Thr Thr Met Gly Pro Lys Arg Ile Gly Thr Gly Asp
 275 280 285

Arg Leu Ile Asn Leu Val Gln Gly Thr Tyr Leu Ala Leu Asn Ala Thr
 290 295 300

Asp Pro Asn Lys Thr Lys Asp Cys Trp Leu Cys Leu Val Ser Arg Pro
 305 310 315 320

Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Ala Ile Leu Gly Asn Tyr Ser Asn Gln Thr
 325 330 335

Asn Pro Pro Pro Ser Cys Leu Ser Thr Pro Gln His Lys Leu Thr Ile
 340 345 350

Ser Glu Val Ser Gly Gln Gly Met Cys Ile Gly Thr Val Pro Lys Thr
 355 360 365

His Gln Ala Leu Cys Asn Lys Thr Gln Gln Gly His Thr Gly Ala His
 370 375 380

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

Tyr Leu Ala Val Pro Asn Gly Thr Tyr Trp Ala Cys Asn Thr Gly Leu
 385 390 395 400

Thr Pro Cys Ile Ser Met Ala Val Leu Asn Trp Thr Ser Asp Phe Cys
 405 410 415

Val Leu Ile Glu Leu Trp Pro Arg Val Thr Tyr His Gln Pro Glu Tyr
 420 425 430

Val Tyr Thr His Phe Ala Lys Ala Val Arg Phe Arg Arg Glu Pro Ile
 435 440 445

Ser Leu Thr Val Ala Leu Met Leu Gly Gly Leu Thr Val Gly Gly Ile
 450 455 460

Ala Ala Gly Val Gly Thr Gly Thr Lys Ala Leu Leu Glu Thr Ala
 465 470 475

<210> 11

<211> 1440

<212> DNA

<213> Feline leukemia virus

<220>

<221> gene

<222> (1)..(1440)

<223> DNA sequence of wildtype "env" gene (gp70)

<400> 11
 atggaaagtc caacgcaccc aaaaccctct aaagataaga ctctctcgtg gaacttagcg 60
 tttctggtgg ggatcttatt tacaatagac ataggaatgg ccaatcctag tccacaccaa 120
 atatataatg taacttggtt aataaccaat gtacaaacta acaccaagc taacgccacc 180
 tctatgtagg gaaccttaac cgatgcctac cctaccctac atgttgactt atgtgacctt 240
 gtgggagaca cctgggaacc tatagtccta aaccaacca atgtaaaaca cggggcacgt 300
 tactcctcct caaaatatgg atgtaaaact acagatagaa aaaaacagca acagacatac 360
 ccctttttacg tctgccccgg acatgcccc tcgttggggc caaagggaac acattgtgga 420
 ggggcacaag atgggttttg tgccgcatgg ggatgtgaga ccaccggaga agcttggtgg 480
 aagcccacct cctcatggga ctatatcaca gtaaaaagag ggagtagtca ggacaatagc 540
 tgtgagggaa aatgcaaccc cctgggttttg cagttcaccc agaagggaag acaagcctct 600
 tgggacggac ctaagatgtg gggattgcga ctataccgta caggatatga ccctatcgct 660

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

ttattcacgg tgtcccgga ggtatcaacc attacgccgc ctcaggcaat gggaccaaac 720
ctagtcttac ctgatcaaaa acccccatcc cgacaatctc aaacagggtc caaagtggcg 780
accagaggc cccaaacgaa tgaaagcgcc ccaaggctctg ttgccccac caccatgggt 840
cccaaacgga ttgggaccgg agatagggtta ataaatttag tacaaggac atacctagcc 900
ttaaatgcca ccgaccccaa caaaactaaa gactgttggc tctgcctggg ttctcgacca 960
ccctattacg aagggtattgc aatcttaggt aactacagca accaaacaaa cccccccca 1020
tcctgcctat ctactccgca acacaaacta actatatctg aagtatcagg gcaaggaatg 1080
tgcataggga ctgttcctaa aaccaccag gctttgtgca ataagacaca acagggacat 1140
acaggggagc actatctagc cgcccccaac ggcacctatt gggcctgtaa cactggactc 1200
accccatgca ttccatggc ggtgctcaat tggacctctg atttttgtgt cttaatcgaa 1260
ttatggccca gagtgactta ccatcaacc gaatatgtgt acacacattt tgccaaagct 1320
gtcaggttcc gaagagaacc aatatcacta acggttgccc ttatgttggg aggacttact 1380
gtagggggca tagccgcggg ggtcggaaca gggactaaag ccctccttga aacagcctga 1440

<210> 12

<211> 42

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(42)

<223> gag-mut1-rneu

<400> 12
aattaagagc tccacgtctc ccccgctaa cagcaactgg cg

42

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(45)

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<223> gag-mut2-1

<400> 13
aattaagagc tccaggtctc cggggctccg cggggctgca agacg 45

<210> 14

<211> 48

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(48)

<223> gag-mut3-r

<400> 14
aattaagagc tccacgtctc cttccctttt gttgtatatc ttttctgc 48

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(48)

<223> gag-mut4-1

<400> 15
aattaagagc tccaggtctc cggaaacccc agaggaaagg gaagaaag 48

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Primer

<220>

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (1)..(34)

<223> Felvgag-l

<400> 16
cggataaggt accatgggcc aaactataac tacc

34

<210> 17

<211> 37

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(37)

<223> Felvgag-r

<400> 17
ttctcagagc tcttagagga gagtggagtt ggcgggt

37

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<223> envl

<400> 18
cggataaggt accatggcca atcctagtcc acc

33

<210> 19

<211> 37

<212> DNA

<213> Primer

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(37)

<223> envr

<400> 19

agttctcaga gctcttaggc tgtttcaagg agggctt

37

<210> 20

<211> 28

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> Primer

<400> 20

atattggatc ccatggccaa cccctccc

28

<210> 21

<211> 34

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 21

attatggctc cctgctgctt cttcctgtct gtgg

34

<210> 22

<211> 30

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> Primer

<400> 22
taataggtct ccagcagcag acctaccct

30

<210> 23

<211> 33

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(33)

<223> Primer

<400> 23
taataggtct ctgtgaacag ggcaatgggg tca

33

<210> 24

<211> 34

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 24
tatttggtct cttcacagtg tccaggcagg tgct

34

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> Primer

<400> 25
tattaggtct cagcttgtgc tgggggggtgg

30

<210> 26

<211> 34

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(34)

<223> Primer

<400> 26
aataaggtct ccaagctgac catctctgag gtgt

34

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(27)

<223> Primer

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<400> 27
attaagagct ctcaggctgt ttccagc 27

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<223> Primer

<400> 28
attgccggtg ccatggagtc cccacccac c 31

<210> 29

<211> 35

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> Primer

<400> 29
atcagaggtc tcccatgcca atgtcaatgg tgaac 35

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(27)

.Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<223> Primer

<400> 30
gatctgggtc tccatggcca acccctc

27

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(36)

<223> Primer

<400> 31
aattatgggtc tcgcagttca gacaactaca aatggc

36

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> Primer

<400> 32
aattatgagc tctcagggcc tgtcagggtc

30

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Primer

<220>

Molgen FeLV-PCT.ST25.txt

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> Primer

<400> 33
aattatggta ccatggagtc cccacccc

28

<210> 34

<211> 35

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(35)

<223> Primer

<400> 34
tataatggtc tcaactgggc tgtttccagc agggc

35

<210> 35

<211> 31

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<223> Primer

<400> 35
atattaggtc tcagatccgg gggggggagg g

31

<210> 36

<211> 30

<212> DNA

<213> Primer

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<223> Primer

<400> 36

atatgtgtct caggagaggg acaagaagag

30

<210> 37

<211> 32

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> Primer

<400> 37

aatatgtgtct ctcagcctgc tggcgatggg gc

32

<210> 38

<211> 32

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> Primer

<400> 38

attatgtgtct ctgcacctga ggctgtacag gc

32

<210> 39

<211> 36

Mologen FeLV-PCT.ST25.txt

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(36)

<223> Primer

<400> 39

aatatgggtct cgggtgctccc tgccggcgagg ggtgca

36

<210> 40

<211> 28

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(28)

<223> Primer

<400> 40

aatatgggtct ctctcctcct gcctctgc

28

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.